

**André Alexandre Lobo
Lopes de Castro**

**Determinação de ácido γ -hidroxibutírico (GHB) em sangue,
urina e cabelo por GC-MS/MS.**

**Avaliação de níveis endógenos e exógenos e sua aplicação
nas áreas da Clínica e Patologia Forense**

**André Alexandre Lobo
Lopes de Castro**

**Determinação de ácido γ -hidroxibutírico (GHB) em sangue,
urina e cabelo por GC-MS/MS.**

**Avaliação de níveis endógenos e exógenos e sua aplicação
nas áreas da Clínica e Patologia Forense**

Dissertação apresentada à Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Forenses, realizada sob a orientação científica da Doutora Helena Teixeira, Professora Afiliada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e coorientação do Doutor Flávio Reis, Investigador Auxiliar do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental do Instituto Biomédico de Imagem e Ciências da Vida (IBILI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Júri

Presidente - Doutora Maria Amélia Ferreira, Diretora da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Doutora Maria de Lurdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos, professora catedrática da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Doutora Teresa Maria Salgado de Magalhães, professora associada convidada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro, professor auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Doutora Helena Maria de Sousa Ferreira e Teixeira, professora afiliada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e orientadora da tese

Doutor Rui Manuel Amaro Pinto, professor auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Dedico este trabalho à Isabel, companheira de vida, e ao Tiago, capaz de fazer o meu mundo parar, sempre que sorri...

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho trouxe-me mais-valias pessoais e profissionais incontornáveis e marcantes. Sem a colaboração e disponibilidade de diversas pessoas e entidades tal não seria possível.

À Prof.^a Doutora Helena Teixeira agradeço a sua exigência, empenho e, acima de tudo, cumplicidade e apoio demonstrados ao longo de todo o trabalho, quer enquanto orientadora, quer enquanto Diretora do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto.

Agradeço também ao Doutor Flávio Reis, que assumiu o difícil papel de coordenador. O seu empenho, envolvimento, disponibilidade e resiliência foram determinantes para a conclusão do trabalho.

À Prof.^a Doutora Teresa Magalhães e a toda a Comissão Científica do Programa Doutoral, agradeço toda a compreensão e apoio demonstrados, bem como à Universidade do Porto, a quem agradeço também a compreensão e abertura demonstradas para a conclusão do trabalho.

Dirijo também um agradecimento aos Corpos Dirigentes do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, quer aos membros do Conselho Diretivo, quer aos Diretores do Serviço de Química e Toxicologia Forenses, (Dr. Mário João Dias e Dr. João Miguel Franco), pelo interesse demonstrado no desenvolvimento do trabalho, pelas necessárias autorizações para a realização do mesmo, bem como pelo apoio e disponibilização de meios e equipamentos necessários.

À equipa do SQTF-N, que me incentivou desde o primeiro dia, agradeço todo o apoio transmitido, bem como a disponibilidade para a articulação entre trabalho pericial e desenvolvimento laboratorial da dissertação. Agradeço, particularmente, à Eng.^a Sónia Tarelho, pelo apoio demonstrado no desenvolvimento quotidiano do trabalho e na discussão dos resultados.

Agradeço à Dr.^a Sara Nunes, do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental do IBILI, o apoio no desenvolvimento e implementação do protocolo de experimentação animal.

Ao Dr. Luis Azevedo, do Departamento de Ciências da Informação e da Decisão em Saúde da FMUP, agradeço a disponibilidade para me elucidar relativamente às questões associadas à análise estatística dos dados obtidos.

Aos meus pais, sogros, irmã, cunhado, sobrinha, familiares e amigos agradeço o seu carinho desinteressado e a paciência com que aceitaram a minha indisponibilidade durante todo este tempo.

À minha esposa agradeço e guardo, acima de tudo, o empenho com que me incentivou a desenvolver este trabalho, a paciência e abnegação com que aceitou a minha indisponibilidade, e a força, inspiração e motivação que me transmitiu, fulcrais para ultrapassar todas as dificuldades que foram surgindo.

Ao meu filho, agradeço-lhe a inata capacidade de me transmitir, diariamente, uma vontade de superação, por ele e para ele...

Palavras-chave

ácido γ -hidroxibutírico (GHB); GC-MS/MS; amostras de sangue e cabelo; valores endógenos e exógenos; intervalo *postmortem*; toxicologia forense.

Resumo

As ciências forenses, onde se inclui a área da toxicologia forense, assumem atualmente uma importância acrescida e uma abrangência muito mais vasta. Com efeito, o impacto da perícia médico-legal na área da toxicologia forense é hoje reconhecidamente elevado e os resultados analíticos revestem-se de crucial importância, sendo cada vez mais valorizados pelas autoridades judiciais. Estes aspetos justificam a procura de métodos analíticos mais específicos e sensíveis, bem como a diversificação das amostras biológicas usadas, para a determinação de substâncias ilícitas com a precisão e fiabilidade exigidas.

O ácido γ -hidroxibutírico (GHB), incluído no panorama de substâncias ilícitas disponíveis com fins psicoativos, tornou-se um fator de maior preocupação e de consequente fiscalização por parte das autoridades a partir dos anos 90. Paralelamente, o seu carácter endógeno, bem como o seu comportamento *postmortem*, traduzem-se em potenciais dificuldades na avaliação e interpretação dos valores obtidos em amostras biológicas, o que justifica a necessidade de mais investigação.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de determinação analítica de GHB em amostras biológicas (urina, sangue total e cabelo), por GC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo, precedido de extração por LLE e/ou precipitação metanólica.

A validação analítica das metodologias permitiu a aplicação das mesmas a um conjunto de amostras reais de sangue e cabelo, bem como à análise de um conjunto de amostras de sangue e pêlo de ratos, provenientes de estudos experimentais que pretendiam mimetizar contextos de toma única e de toma repetida.

A metodologia analítica desenvolvida e validada apresentou valores de sensibilidade e limites de deteção e quantificação melhorados e aplicáveis a partir de níveis considerados endógenos, para além de ter cumprido todos os critérios de validação analiticamente aceites. A consequente análise de amostras reais revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas ao nível da avaliação do intervalo *postmortem*.

O estudo de experimentação animal permitiu confirmar o perfil farmacocinético do GHB em sangue, bem como o seu comportamento, quer em contexto de toma repetida quer em contexto de toma única. Em contrapartida, as amostras de pêlo permitiram a diferenciação entre valores endógenos e níveis associados a consumo de GHB.

Em conclusão, este trabalho permitiu o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de GHB em amostras biológicas (sangue, urina e cabelo) passível de ser aplicada na rotina pericial médico-legal em toxicologia forense. Adicionalmente, este estudo forneceu dados relevantes para uma distinção fundamentada entre valores de GHB endógenos e de origem exógena, bem como para uma potencial utilização deste composto como biomarcador de determinação do intervalo *postmortem*, o que se reveste de grande importância no contexto forense.

keywords

γ -hidroxibutiric acid (GHB); GC-MS/MS; whole blood and hair samples; exogenous and endogenous values; *postmortem* interval; forensic toxicology.

abstract

Forensic sciences, including Forensic Toxicology, have gained an increased significance and a much wider scope. In fact, the impact of a forensic toxicology analysis and further interpretation is nowadays recognized as crucial, with increasing value for Justice authorities. These remarks justify the search for more specific and sensitive analytical methods, as well as diversification of biological samples used for the determination of illicit substances with the required precision and reliability.

γ -hidroxibutiric acid (GHB), included in the panorama of illicit substances available with psychoactive purposes, has become a factor of concern and consequent supervision by the authorities since the 90s. At the same time, its endogenous origin, along with its *postmortem* behavior, translate into potential difficulties in the evaluation and interpretation of values obtained in biological samples, which justifies the need of further research.

The main aim of this work was the development and validation of an analytical method for the quantification of GHB in biological samples (urine, whole blood and hair), using GC-MS/MS (triple quad), after an extraction procedure by LLE and/or methanolic precipitation.

The analytical validation of the methodologies enabled the implementation in a set of real cases' samples (whole blood and hair), along with the analysis of rat whole blood and fur samples derived from an experimental study mimicking conditions of single and repeated consumption.

The developed and validated analytical procedure has shown a good sensitivity and improved limits of detection and of quantification, applicable at the endogenous range. In addition it has completed all analytically accepted validation criteria. The resulting analysis of real samples revealed statistically significant differences as to *postmortem* interval is concerned.

The animal study allowed the confirmation of GHB pharmacokinetic profile in blood, as well as its behavior both in single and repeated dose context. On the other hand, rat fur samples allowed the differentiation between endogenous values and levels associated with GHB consumption.

In conclusion, this work allowed the development of an analytical methodology for the determination of GHB in biological samples (whole blood, urine and hair), with possible application to the forensic's laboratory routine. Additionally, this study provided relevant data for a reasoned distinguish between endogenous and exogenous GHB values. Furthermore, the obtained data suggest a possible use of this compound as biomarker for the estimation of *postmortem* interval, which is of great importance in forensic context.

Índice

AGRADECIMENTOS**RESUMO – ABSTRACT****ÍNDICE** **i****DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS: PUBLICAÇÕES E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS** **vii****LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS** **ix****LISTA DE FIGURAS** **xiii****LISTA DE TABELAS** **xv****Parte I – REVISÃO DA LITERATURA****Capítulo I – Ácido γ - Hidroxibutírico (GHB)**

1 – ANTECEDENTES HISTÓRICOS	3
2 – ESTRUTURA QUÍMICA E PRINCIPAIS PROPRIEDADES	5
3 – PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS	6
3.1 – Mecanismo de ação	6
3.1.1 – Percursos	8
3.2 – Efeitos farmacodinâmicos	11
4 – TOXICOCINÉTICA	15
4.1 – Absorção	15
4.2 – Distribuição	16
4.3 – Metabolismo	16
4.4 – Eliminação	19
5 – PRODUÇÃO ENDÓGENA DE GHB	20
5.1 – GHB acidúria	20

Capítulo II – GHB - Consumo e Contextualização Forense

1 – PREVALÊNCIA E PADRÕES DE CONSUMO ATUAIS	23
2 – LEGISLAÇÃO	26
3 – FORMAS DE CONSUMO	27
4 – DETERMINAÇÃO/APARECIMENTO DE GHB <i>POSTMORTEM</i>	28
5 – GHB COMO MARCADOR DO INTERVALO <i>POSTMORTEM</i>	30

Capítulo III – Determinação de GHB em Amostras Biológicas: Sangue, Urina e Cabelo

1 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS	33
1.1 – Sangue	33
1.2 – Urina	36
1.3 – Cabelo	39
1.4 – Estabilidade do GHB em amostras biológicas	42
1.5 – Recolha e armazenamento de amostras	44
2 – DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE GHB	45
2.1 – Métodos de preparação e/ou extração das amostras	46
2.1.1 - Interferências nos resultados quantitativos de GHB	47
2.2 - Métodos de rastreio	48
2.2.1 - Rastreio de GHB por imunoensaios	48
2.2.2 – Rastreio de GHB por GC-FID	48
2.3 – Derivatização	49
2.4 – Métodos de confirmação	50
2.4.1 – GC-MS	51
2.4.2 – U(H)PLC-MS/MS	52
2.4.3 – GC-MS/MS	52
2.5 - Considerações finais	53

Parte II – Definição e Justificação dos Objetivos

1 – Fundamentos Gerais para a Definição dos Objetivos	57
2 – Objetivos Gerais e Objetivos Específicos	58
2.1 – Objetivos gerais	58
2.2 – Objetivos específicos	58

Parte III – Trabalho Experimental**Capítulo I – Caracterização do Método Analítico para Determinação de GHB em Amostras Biológicas**

1 – Introdução	63
2 – Definição dos Parâmetros de Validação	63
3 – Metodologia de Validação Aplicada no Estudo	64
3.1 – Especificidade/seletividade	64
3.2 – Limites de deteção e de quantificação	64
3.3 – Linearidade/curva de calibração	65
3.4 – Precisão e exatidão	66
3.5 – Recuperação	67
4 – Material e Métodos	67
4.1 – Substâncias estudadas	67
4.2 – Reagentes/gases	68
4.3 – Material utilizado	68
4.4 – Sistema de GC-MS/MS	68

Capítulo II – Desenvolvimento do Método Analítico para a Deteção e Quantificação de GHB nas Amostras Biológicas

1 – Ensaaios Efetuados	71
1.1 – Estudo em sangue e urina	71
1.1.1 – Seleção e preparação da amostra biológica	71
1.1.2 – Escolha do padrão interno	71
1.1.3 – Escolha do procedimento extrativo adequado	72
1.1.4 – Extração de GHB por metodologia líquido-líquido	74
1.1.5 – Validação do método analítico – resultados obtidos	75

a) Desenvolvimento e otimização das condições instrumentais de análise	75
b) Especificidade/seletividade	76
c) Limites de detecção e de quantificação	76
d) Linearidade/curva de calibração	77
e) Precisão e exatidão	78
f) Recuperação	81
1.2 – Estudo em cabelo	83
1.2.1 – Seleção e preparação da amostra biológica	83
1.2.2 – Extração de GHB a partir do cabelo por extração líquido-líquido	83
1.2.3 – Validação do método analítico – resultados obtidos	84
a) Especificidade/seletividade	84
b) Limites de detecção e de quantificação	84
c) Linearidade/curva de calibração	84
d) Precisão e exatidão	85
2 – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	87
Capítulo III – Aplicação do Método Analítico Validado a Amostras de Casos Reais <i>Postmortem</i>	
1 – INTRODUÇÃO	91
2 – MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 – Caracterização dos indivíduos/amostras em análise	92
2.2 – Colheita das amostras	92
2.3 – Preparação das amostras para determinação de GHB	95
2.4 – Testes estatísticos utilizados	95
2.4.1 – Teste de Shapiro-Wilk	95
2.4.2 – Análise de variâncias (ANOVA)	95
2.4.3 – Teste de Tukey para comparação de médias	96
2.4.4 – Teste de Levene para comparação de médias	96
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1 – Sangue	97
3.1.1 – Género	98
3.1.2 – Idade	98
3.1.3 – Diagnóstico diferencial médico-legal	99
3.1.4 – Presença/ausência de outras substâncias	100

3.1.5 – Intervalo <i>postmortem</i>	100
3.2 – Cabelo	102
3.2.1 – Género	103
3.2.2 – Idade	104
3.2.3 – Diagnóstico diferencial médico-legal	104
3.2.4 – Intervalo <i>postmortem</i>	105
3.2.5 – Presença/ausência de outras substâncias	106
3.3 – Razão cabelo/sangue	107
3.3.1 – Intervalo <i>postmortem</i>	108
4 – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	108

Capítulo IV – Determinação de GHB *Antemortem* e *Postmortem* em Sangue e Pêlo após Exposição Pontual e Repetida em Rato

1 – INTRODUÇÃO	113
2 – MATERIAL E MÉTODOS	114
2.1 – Caracterização dos animais e condições experimentais	114
2.2 – Modelo animal: protocolos e grupos em estudo	114
2.3 – Colheita das amostras	116
2.4 – Preparação das amostras para determinação de GHB	116
2.5 – Análise estatística	116
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1 – Perfil farmacocinético após toma única	117
3.2 – Comportamento <i>postmortem</i> após toma única	118
3.2.1 – Amostras de sangue	118
3.2.2 – Amostras de pêlo	120
3.2.3 – Razão das concentrações de GHB em pêlo e em sangue	121
i) Razão pêlo/sangue	121
ii) Razão sangue/pêlo	122
3.3 – Comportamento <i>postmortem</i> após consumo repetido	124
3.3.1 – Amostras de sangue	124
3.3.2 – Amostras de pêlo	126
3.3.3 – Razão de concentração de GHB em amostras de pêlo e sangue	128
4 – COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	130

Capítulo V – Conclusões

CONCLUSÕES	133
-------------------	------------

Parte IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
-----------------------------------	------------

ANEXOS

DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS: PUBLICAÇÕES E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

PUBLICAÇÕES

- Castro AL, Dias M, Reis F, Teixeira HM, “Gamma-hydroxybutyric acid endogenous production and post-mortem behaviour - The importance of different biological matrices, cut-off reference values, sample collection and storage conditions”, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 27 (2014), 17-24.
- Castro AL, Tarelho S, Dias M, Reis F, Teixeira HM, “A fast and reliable method for GHB quantitation in whole blood by GC-MS/MS (TQD) for forensic purposes”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 119 (2016) 139–144.
- Castro AL, Tarelho S, Dias M, Reis F, Teixeira HM, “Comparison of endogenous GHB concentrations in blood and hair in death cases with emphasis on the post mortem interval”, *International Journal of Legal Medicine*, 130 (2016), 959–965.

COMUNICAÇÕES ORAIS

- Castro A, Tarelho S, Franco J, Reis F, Teixeira HM, “Valores endógenos de GHB em amostras biológicas *postmortem* – Determinação analítica e avaliação estatística”, I Conferência do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Coimbra, 30 e 31 de Outubro de 2014.

POSTERS

- Castro A, Reis F, Teixeira H, “Determinação de GHB em Amostras Biológicas”, I Encontro de Doutorandos da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 14 de Dezembro de 2011.
- Castro A, Reis F, Teixeira H, “Determinação de GHB em Sangue por SPE e GC-MS-MS”, 11º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Évora, 9 e 10 de Novembro de 2012.
- Castro A, Reis F, Teixeira H, “Determinação de GHB em Amostras Biológicas com Fins Forenses”, II Encontro de Doutorandos da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 14 de Dezembro de 2012.
- Castro A, Reis F, Teixeira H, “Quantification of GHB by SPE and GC-MS-MS in whole blood samples for forensic purposes”, 51st Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, Funchal, 2-6 de Setembro de 2013.

Lista de Siglas e Abreviaturas

σ : Desvio-Padrão

μ L: Microlitro

1,4-BD: 1,4-Butanediol

a: Ordenada na origem

ACN: Acetonitrilo

APCI: Atmospheric pressure chemical ionization

b: Declive da reta

BSTFA: *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CV: Coeficiente de variação

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EMCDDA: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction

eV: electro Volts

FID: Detetor de ionização de chama

GABA: Ácido γ – aminobutírico

GBL: γ – butirolactona

GC: Cromatografia gasosa

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GC-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em *tandem*

GHB: Ácido γ – hidroxibutírico

GHB- d_6 : Ácido γ – hidroxibutírico hexadeuterado

GHB- d_6 -diTMS: Ácido γ – hidroxibutírico hexadeuterado trimetilsililado

GHB-diTMS: Ácido γ – hidroxibutírico trimetilsililado

GVL: γ – valerolactona

HCA: Ácido 6-hidroxicapróico

HILIC: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HIV/SIDA: Vírus da Imunodeficiência Humana / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Kg: Kilograma

IQ: Ião de Quantificação

IT: Ion trap

L: Litro

LC-MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

LC-MS/MS: Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a espectrometria de massa em *tandem*

LLE: Extração líquido-líquido

LLOQ: Limite inferior de quantificação

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

LSD: Dietilamida do ácido lisérgico

***m/z*:** razão massa/carga

MDMA: 3,4 – Metilenedioximetanfetamina

min: Minutos

mL: Mililitro

MRM: Multi reaction monitoring

MSTFA: *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida

MTBSTFA: *N*-metil-*N*-(*t*-butilmetilsilil)trifluoroacetamida

n.a.: não aplicável

n.d.: não divulgado

ng: nanograma

P: Plasma

PI: Padrão interno

PMI: Intervalo *postmortem*

Quad: quadrupolo

r^2 : Coeficiente de correlação

REM: Rapid eye movement

RPM: Rotações por minuto

SQTF-N: Serviço de Química e Toxicologia Forenses

RSD: Relative standard variation

S: Soro

s^2 : Variância

SIM: Single ion monitoring

SNC: Sistema nervoso central

SoHT: Society of Hair Testing

SPE: Extração em fase sólida

SPME: Microextração em fase sólida

ST: sangue total

T_{1/2}: tempo de meia-vida

TMCS: Trimetilclorosilano

uma: Unidades de Massa Atômica

UHPLC-MS-MS: Cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massa em *tandem*

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do GHB

Figura 2 - Estrutura química da GBL (a), do 1,4 – butanediol (b) e do ácido γ -aminobutírico (c)

Figura 3 - Via metabólica de síntese e metabolismo do GHB

Figura 4 - Obtenção do GHB a partir da GBL

Figura 5 - Conversão do 1,4 – butanediol em GHB

Figura 6 - Apreensões de GHB em Kg (a) e em L (b)

Figura 7 - Apreensões de GBL em Kg (a) e em L (b)

Figura 8 - Procedimento utilizado nos ensaios de recuperação para amostras de sangue total e urina e respetiva fórmula de cálculo (comp. – composto; PI – padrão interno)

Figura 9 – Representação gráfica da concentração sanguínea de GHB em função do intervalo *postmortem*. Valores em média \pm desvio padrão (SD).

Figura 10 – Representação gráfica da concentração de GHB em cabelo, em função do intervalo *postmortem*. Valores em média \pm desvio padrão (SD).

Figura 11 – Protocolo experimental dos estudos pontual e repetido. †, Sacrifício; *, recolha de amostras de sangue e pêlo (n=5 em cada tempo de recolha).

Figura 12 – Evolução da concentração sanguínea de GHB (mg/L) em função do tempo após a toma. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 13 – Evolução da concentração sanguínea de GHB (mg/L) em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) em animais submetido a uma toma única de GHB e sacrifício 2h após. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 14 – Evolução da concentração de GHB em pêlo (ng/mg) em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) em animais submetidos a uma toma de GHB e sacrifício 2h após. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 15 – Evolução da razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) e a obtida em amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha *postmortem*. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 16 – Evolução da razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) e pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 17 – Evolução da concentração sanguínea de GHB (mg/L) em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) em animais submetidos a consumo repetido de GHB e sacrifício 2h após a última toma. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 18 – Concentração de GHB (ng/mg) em pêlo nos diversos tempos de recolha *postmortem*. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 19 – Razão da concentração de GHB no sangue (mg/L) e em pêlo (ng/mg) nos diversos tempos de recolha. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Figura 20 – Razão da concentração de GHB no pêlo (ng/mg) e sangue (mg/L), nos diversos tempos de recolha. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Apreensões de GHB, GBL e 1,4-BD, por ano.

Tabela 2 – Métodos de detecção e quantificação de GHB em sangue.

Tabela 3 – Métodos de detecção e quantificação de GHB em urina.

Tabela 4 – Métodos de detecção e quantificação de GHB em cabelo.

Tabela 5 – Resultados obtidos em estudos de estabilidade, tempo de recolha de amostragem e armazenamento.

Tabela 6 – Condições cromatográficas usadas.

Tabela 7 – Grupos de iões definidos para aquisição em modo SIM/SIM.

Tabela 8 – Resultados obtidos nos testes de extração para o método adaptado de Villain *et al.*.

Tabela 9 – Resultados obtidos nos testes de extração para o método adaptado de Shima *et al.*.

Tabela 10 – Valores obtidos nos testes de homocedasticidade de variâncias.

Tabela 11 – Aplicação do teste de F.

Tabela 12 – Estudo dos fatores de ponderação.

Tabela 13 – Cálculo das estimativas da precisão.

Tabela 14 – Dados obtidos no estudo da precisão para o nível baixo de GHB (precisão intermédia, repetibilidade e limite de repetibilidade).

Tabela 15 – Dados obtidos no estudo da precisão para o nível alto de GHB (precisão intermédia, repetibilidade e limite de repetibilidade).

Tabela 16 – Dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 500 ng/mL de GHB para o estudo da precisão.

Tabela 17 – Transformação dos dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 500 ng/mL de GHB para o estudo da precisão.

Tabela 18 – Dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 80000 ng/mL de GHB para o estudo da precisão.

Tabela 19 – Transformação dos dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 80000 ng/mL de GHB para o estudo da precisão.

Tabela 20 – Resultados obtidos nos ensaios de recuperação.

Tabela 21 – Cálculo das estimativas da precisão.

Tabela 22 – Dados obtidos no estudo da precisão para GHB (precisão intermédia, repetibilidade e limite de repetibilidade).

Tabela 23 – Dados obtidos na análise de amostras com GHB para o estudo da precisão.

Tabela 24 – Transformação dos dados obtidos na análise de amostras com GHB para o estudo da precisão.

Tabela 25 – Caracterização geral dos casos analisados.

Tabela 26 – Concentrações de GHB obtidas para as amostras de sangue analisadas.

Tabela 27 – Valores de GHB em sangue em função do género.

Tabela 28 – Valores de GHB em sangue em função da faixa etária.

Tabela 29 – Valores de GHB em sangue em função do diagnóstico diferencial médico-legal.

Tabela 30 – Valores de GHB em sangue em função da ausência ou presença de outras substâncias.

Tabela 31 – Valores de GHB em sangue em função do intervalo *postmortem*.

Tabela 32 – Concentrações de GHB obtidas para as amostras de cabelo analisadas.

Tabela 33 – Valores de GHB em cabelo em função do género.

Tabela 34 – Valores de GHB em cabelo em função da faixa etária.

Tabela 35 – Valores de GHB em cabelo em função do diagnóstico diferencial médico-legal.

Tabela 36 – Valores de GHB em cabelo em função do intervalo *postmortem*.

Tabela 37 – Valores de GHB em cabelo em função da ausência ou presença de outras substâncias.

Tabela 38 – Razões de concentrações de GHB no cabelo e no sangue obtidas nos casos analisados.

Tabela 39 – Valores das razões das amostras estudadas em função do intervalo *postmortem*.

Tabela 40 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha.

Tabela 41 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha *postmortem*.

Tabela 42 – Concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*.

Tabela 43 – Razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) e a obtida em amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha *postmortem*.

Tabela 44 – Razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) e de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*.

Tabela 45 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha.

Tabela 46 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha.

Tabela 47 – Concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*.

Tabela 48 – Concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha.

Tabela 49 – Razões das concentrações de GHB obtidas nas amostras de pêlo (em ng/mg) e de sangue (mg/L) nos diversos tempos de recolha.

Tabela 50 – Razões da concentração de GHB em amostras de pêlo (em ng/mg) e de sangue (mg/L) nos diversos tempos de recolha.

Parte I – REVISÃO DA LITERATURA

Capítulo I – Ácido γ -Hidroxibutírico (GHB)

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

O ácido gama-hidroxibutírico (GHB) foi inicialmente desenvolvido em 1960, como anestésico, por Henri Laborit (Freese *et al.*, 2002). Apresenta uma história de utilização médica de mais de 30 anos, tanto na Europa como nos Estados Unidos da América, onde foi, inclusivamente, vendido como suplemento dietético para culturistas, encontrando-se atualmente inserido na cadeia de consumo de substâncias ilegais desse meio desportivo (Wood, 2004; Richard, 2005; Shima, 2005). A partir dos anos 90 do século XX, este composto passou a ser alvo da atenção e preocupação das autoridades, com consequente fiscalização, devido ao seu consumo ilícito (Elian, 2001; Nicholson, 2001). Curiosamente, desde os primeiros casos de abuso descritos, surgidos no início da década de 90, que o padrão de consumo se foi alterando, quer na forma de administração, quer na evolução representada pela utilização dos seus precursores químicos (Gamabutirolactona e 1-4-butanediol, descritos adiante neste trabalho). A versatilidade de utilização do composto é demonstrada também pelos próprios objetivos de utilização e descrição de consequentes efeitos adversos. (Anderson *et al.*, 2006).

Os estudos iniciais de síntese de GHB, nos anos 60, tinham como objetivo a preparação e desenvolvimento de um análogo do ácido gama-aminobutírico (GABA) para aplicação terapêutica em pacientes com tontura e desequilíbrio. Considerando a facilidade do GHB em transpor a barreira hematoencefálica, pensou-se que, deste modo, se poderia facilitar a síntese do GABA (Couper e Marinetti, 2002). Apesar dos resultados insatisfatórios na produção do GABA, foi, no entanto, descoberta a sua possível capacidade anestésica (Couper e Marinetti, 2002). No entanto, esta mesma possibilidade de utilização anestésica foi posteriormente abandonada, uma vez que o GHB não apresentava propriedades analgésicas e tinha um tempo de ação anestésica imprevisível, conduzindo a episódios graves entre consciência e inconsciência, em doses compatíveis com o procedimento de anestesia (Couper e Marinetti, 2002). Mesmo assim, o GHB era ainda utilizado no início da década de 2000 como complemento de anestesia e agente hipnótico em alguns países europeus (Couper e Marinetti, 2002).

Em 1966 foi também estudado o potencial anestésico dos seus precursores, nomeadamente da γ -butirolactona (GBL) e do 1,4-butanediol, mas os resultados foram semelhantes aos obtidos com o GHB, o que é compreensível, uma vez que qualquer um dos precursores passa muito rapidamente a GHB após a sua administração oral (Couper e Marinetti, 2002).

A sua utilização sucessiva ao longo das últimas décadas prolongou-se através de um consumo legal e regulado, como suplemento dietético, quer em lojas de parafarmácia e promoção de bem-estar físico, quer no mercado digital, em sítios da *internet*, como agente impulsionador de crescimento de massa muscular para culturistas. A sua utilização, alegadamente sem qualquer efeito secundário adverso, abarcava a substituição dos esteroides anabolizantes, como reversor da calvície e recuperador da cor natural do cabelo, como fornecedor de energia e impulsionador anímico ou como potenciador atlético e sexual (Couper e Marinetti, 2002). Paralelamente, a utilização clínica incluiu a indução de anestesia e a utilização terapêutica foi caracterizada pela sua incorporação em protocolos de tratamento de diversificadas situações clínicas, tais como, insónia, depressão, ansiedade, obesidade, alcoolismo, desabitação de opiáceos e disfunção sexual (Weir, 2000; Rodgers *et al.*, 2006).

A proibição do seu uso, devido aos efeitos aditivos e aos efeitos secundários adversos, associada à fácil disponibilização e venda do produto através da *internet*, conduziu a diversos padrões de consumo ilícito (Anderson *et al.*, 2006).

Paulatinamente, a procura do GHB para utilização como “club drug”, ou “substância de uso recreativo”, surgiu no início dos anos 90, tendo o seu consumo, desde então, sido reportado em diversos países, desde os E.U.A. até aos países do extremo oriente e oceania (Weir, 2000). Os casos descritos de deteção em ambiente de emergência hospitalar sofreram um aumento crescente, tanto na Europa como nos E.U.A., sugerindo uma elevada popularidade do composto entre consumidores (Rodgers *et al.*, 2004).

Note-se que, no entanto, a sua utilização no meio do culturismo não cessou com a ilegalização do seu consumo. De facto, esta ação conduziu à introdução do GHB no mercado ilícito ligado a este desporto, pretendendo os seus consumidores usufruir dos efeitos de promoção do aumento da massa muscular, bem como de aceleração do ritmo metabólico para usufruto de uma suposta capacidade de “queimador de gordura corporal” (Weir, 2000).

Os seus efeitos anestésicos e de ação sobre a memória de curto prazo promoveram também a sua utilização como “Droga da Violação”, utilizada por

predadores sexuais como substância facilitadora do abuso sexual (Anderson *et al.*, 2006).

2. ESTRUTURA QUÍMICA E PRINCIPAIS PROPRIEDADES

O GHB é um componente endógeno dos tecidos de mamíferos, nomeadamente do tecido cerebral, com concentrações mais elevadas no hipotálamo e no gânglio basal (Rodgers *et al.*, 2004). É caracterizado como um hidroxíácido carboxílico de cadeia curta (Figura 1) (Elian, 2002; Fukui *et al.*, 2003; Elliott, 2004; Uys, 2005; Crunelli, 2006).

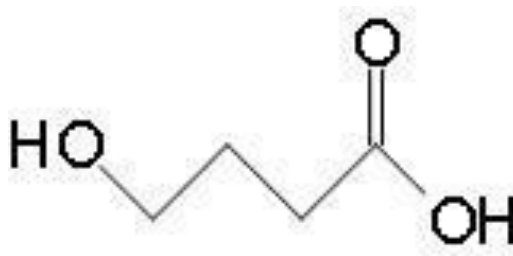


Figura 1 – Estrutura química do GHB

Apresenta-se sob a forma de líquido ou pó (Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004), e tem diversas designações químicas, nomeadamente: ácido γ -hidroxibutírico, 4-hidroxibutirato e oxibato de sódio (como formulação terapêutica). Os “nomes de rua internacionais” e nomes comerciais incluem Alcover, Xyrem, Anectamine, Degreaser + Lye, Easy Lay, Everclear, G, G-caps, Gamma-OH, Grievous Bodily Harm, Georgia Home Boy, Great Hormones at Bedtime, Liquid Ecstasy, Liquid X, Natural Sleep 500, Oxy-sleep, Salt water, Scoop, Soap, Smart drug, Somatomax-PM, Somsanit, e Vita G (Couper e Marinetti, 2002).

O GHB é pouco solúvel em solventes orgânicos e pouco lipofílico, sendo bastante hidrofílico. A fórmula molecular do ácido livre de GHB é $C_4H_8O_3$, sendo a sua massa molecular de 104,10 u.m.a., com um pKa de 4,72. A sua disponibilização comercial lícita, quer para uso terapêutico, quer para utilização analítica, é usualmente garantida através do seu sal de sódio (GHB.Na), cuja fórmula molecular é $C_4H_7NaO_3$, de massa molecular 126,1 u.m.a. (Couper e Marinetti, 2002).

O GHB não se encontra quimicamente num estado estático, mesmo *in vitro*. De facto, em solução, este coexiste em equilíbrio com a GBL. O *ratio* das duas formas

depende sempre da matriz e do respectivo pH. Sabendo-se da possibilidade do GHB coexistir com a GBL em estado de equilíbrio, de acordo com a matriz e o pH da mesma, é sabido que no sangue, por exemplo, a forma do ácido é a predominante, uma vez que a lactonase endógena converte qualquer lactona eventualmente presente (Couper e Marinetti, 2002).

Contrariamente, em matrizes onde esta enzima não se encontre presente, como a urina ou o conteúdo gástrico, as duas formas atingirão um equilíbrio químico, estando ambas presentes. Mesmo que apenas tenha sido consumido GHB, a GBL pode ser detetada no conteúdo gástrico ou urina, dependendo do tempo após ingestão, temperatura, e pH da matriz (Couper e Marinetti, 2002).

3. PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS

3.1. MECANISMO DE AÇÃO

Sendo uma substância naturalmente produzida no sistema nervoso central (SNC), pensa-se que o GHB poderá estar envolvido na mediação de processos controlados pelo cérebro, incluindo a regulação dos ciclos de sono, temperatura corporal, metabolismo da glicose no cérebro e memória, embora o seu mecanismo de ação completo não seja ainda totalmente compreendido (Weir, 2000; Couper e Marinetti, 2002; Smith *et al.*, 2002; Gahlinger, 2004; Moriya e Hashimoto, 2005).

Estruturalmente associado com o GABA (Figura 2), o GHB é simultaneamente um precursor e um metabolito daquele (Weir, 2000; Britt e McCance-Katz, 2005; Uys, 2005), sendo considerado uma substância depressora do SNC, assim como os seus precursores, embora estes apenas o sejam pela sua rápida passagem a GHB, após entrada no organismo (Couper e Marinetti, 2002; Smith *et al.*, 2002; Marinetti *et al.*, 2005; Ricaurte e McCann, 2005; Hopfer *et al.*, 2006). Este composto afeta, também, os sistemas neurotransmissores endógenos, nomeadamente da dopamina e da serotonina, com um aumento de libertação de alguns deles, bem como ainda da dinorfina (Hechler *et al.*, 1991; Ricaurte e McCann, 2005; Crunelli, 2006).

O seu mecanismo de ação baseia-se na incapacidade de ligação aos recetores GABA_A e capacidade de ligação não competitiva aos recetores GABA_B, desde que se encontre em concentrações superiores às concentrações consideradas normais, provocando alterações na transmissão da dopamina (Couper e Marinetti, 2002; Britt e

McCance-Katz, 2005). Existem ainda recetores muito específicos com alta e baixa densidades, diferentes dos recetores GABA, denominados recetores GHB. Estes últimos encontram-se mais expressos no hipocampo, córtex cerebral e áreas dopaminérgicas (Couper e Marinetti, 2002, Britt e McCance-Katz, 2005; Dimitrijevic *et al.*, 2005; Uys, 2005). Apresenta, por isso, um mecanismo de ação duplo (Uys, 2005; Cook *et al.*, 2006). O GHB inibe a libertação de dopamina e ativa a tirosina hidroxilase, aumentando em conjunto os níveis de dopamina nas terminações nervosas e impedindo a sua libertação, levando aos efeitos de reforço de ação do GHB, nomeadamente quando em associação com a 3,4-Metilenodeoximetanfetamina (MDMA) e o álcool (Couper e Marinetti, 2002, Britt e McCance-Katz, 2005; Uys, 2005; Crunelli, 2006).

A diminuição da concentração de GHB conduz a uma desinibição dos neurotransmissores excitatórios (glutamato, norepinefrina e dopamina), provocando a sintomatologia associada a um síndrome de abstinência (Rodgers *et al.*, 2004).

O GHB administrado exogenamente atinge rapidamente o cérebro, com uma rápida passagem através da barreira hemato-encefálica. Assumindo-se que os seus efeitos ansiolíticos estão relacionados com a interação com os recetores GABA_A, sugere-se atualmente que os efeitos farmacológicos e clínicos importantes no seu uso recreativo possam ser mediados pelo recetor GABA_B (Rodgers, *et al.*, 2004). O aumento da concentração de serotonina devido à ação do GHB deve-se, muito provavelmente, a um aumento da concentração e biodisponibilidade de triptofano, o precursor da serotonina. Tal acumulação será devida a uma influência no mecanismo de transporte do triptofano através das membranas celulares neuronais e da barreira hemato-encefálica (Couper e Marinetti, 2002; Richard, 2005; Uys, 2005; Crunelli, 2006; Sassenbroeck *et al.*, 2007).

Quando administrado por via oral, o GHB atinge rapidamente o cérebro, com os consequentes efeitos ansiolíticos, sedativos e eufóricos. Estes poderão surgir a partir da potenciação dos sistemas dopaminérgicos cerebrais e através do envolvimento do sistema ligado à serotonina, sendo potenciada uma resposta de reabsorção desta através do aumento do transporte do triptofano (Rodgers *et al.*, 2006).

O GHB estimula a libertação da hormona do crescimento, ativando paralelamente a via das pentoses-fosfato, a qual desempenha um papel importante na síntese proteica. Neste sentido, o GHB reduz a taxa de degradação das proteínas pelo organismo, conduzindo a um aumento da massa muscular e consequente perda de gordura (Rodgers *et al.*, 2004).

Sendo utilizado ilicitamente neste contexto, estudos controlados constataram um aumento da quantidade de hormona de crescimento no plasma, com níveis cerca de 10 vezes superiores ao normal, aproximadamente 45 minutos após a dosagem (Couper e Marinetti, 2002). No entanto, outros estudos concluíram que a administração prolongada de GHB não afeta a massa muscular, não sendo possível distinguir ou detetar qualquer aumento na libertação da hormona de crescimento no grupo tratado com GHB (Couper e Marinetti, 2002). Encontra-se igualmente descrita a deteção de valores aumentados de prolactina em consumidores de GHB (Couper e Marinetti, 2002).

No entanto, outras duas fontes são associadas à formação de GHB: GBL, um precursor endógeno e 1,4-butanediol (Nicholson, 2001; Couper e Marinetti, 2002, Smith *et al.*, 2002; Elliott, 2003; Freese *et al.*, 2003; Rodgers *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2005; Marinetti *et al.*, 2006).

3.1.1. PERCURSOES

Além da disponibilização do GHB no “mercado negro”, a venda dos seus precursores legais, a γ -butirolactona (GBL), uma lactona ciclizada a partir do GHB, e 1,4-butanediol, um álcool alifático (Figura), tornaram a sua obtenção ainda mais simples (Rodgers *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2005). Estes dois precursores são maioritariamente usados como solventes industriais e são ambos disponibilizados no estado líquido (Couper e Marinetti, 2002).

Contrariamente ao GHB, o qual não apresenta qualquer utilização industrial, estes dois precursores estão envolvidos em diversos processos industriais, nomeadamente na produção de outros químicos, sendo constituintes de produtos de limpeza, solventes, decapantes de tinta, desengordurantes de peças metálicas, nomeadamente motores, removedores de verniz das unhas e constituintes das colas de cianoacrilato (Couper e Marinetti, 2002).

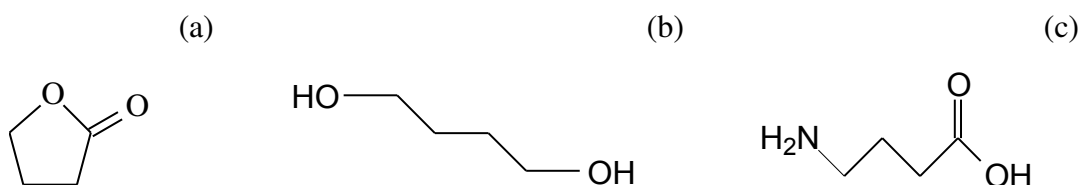


Figura 2 – Estrutura química da GBL (a), do 1,4 – butanediol (b) e do GABA (c).

A fórmula molecular da GBL é $C_4H_6O_2$ e a sua massa molecular é de 86,09 u.m.a.. Apresenta nomenclatura variada, quer ao nível da designação química [2(3)-dihidro-furanona dihidro, dihidro-2(3H) furanona, 4-butirolactona, furanona, lactona do ácido butírico, α -butirolactona, 4-hidroxi- γ -lactona, 4-butanolida, Ácido 4-deoxitetrónico, éster cíclico do ácido γ -hidroxibutírico, e tetrahidro-2-furanona], quer ao nível dos “nomes de rua” e nomes comerciais: Beta-Tech, BLO, Blue Nitro, Eclipse 4.0, Firewater, Furan, Furomax, G3, Gamma-6480, Gamma BL, *Gamma-G*, Gamma Ram, Gen X, GH Gold, *GH Release*, Jolt, Insom-X, Invigorate, *InvigorateX-Depress*, Miracle Cleaning Products, NCI-C55875, Nu-Life, ReActive, Regenerize, Remedy GH, REMForce, Renewsolvent, RenewTrient, Rest-Eze, *GH Revitalizer*, Revivarant, *Revivarant G*, V3, Verve, Verve 5.0, e Wax Stripper. É usada como aditivo na indústria agro-alimentar, com diversas utilizações, assim como solvente industrial (Couper e Marinetti, 2002; Tateo e Bononi, 2003).

A sua ação farmacológica advém do facto de passar automaticamente a GHB, ou seja, o GHB acaba por ser a forma farmacologicamente ativa da GBL. Efetivamente, já desde a década de 60 do século XX que se evidenciou que a GBL não tem qualquer ação depressora do SNC por si só (Couper e Marinetti, 2002).

Conforme referido, e considerando que a GBL e o GHB se encontram mutuamente na procura de equilíbrio químico, a conversão da GBL em GHB é relativamente fácil, sem necessidade de equipamento laboratorial complexo e caro. Após a sua ingestão é mais rapidamente absorvida do que o GHB, por ser mais lipofílica, sendo metabolizada em GHB através de lactonases endógenas por hidrólise, enquanto o GHB é convertido em GBL por esterificação intramolecular (Couper e Marinetti, 2002; Smith *et al.*, 2002; Hennessy *et al.*, 2004; Ricaurte e McCann, 2005; Richard *et al.*, 2005).

A conversão de GHB em GBL, e vice-versa, é um assunto ao qual foi dedicada alguma atenção na literatura consultada. Efetivamente, essa interconversão em meio aquoso é observável e poderá ter implicações importantes na procura e utilização da

GBL por consumidores de GHB, quer no seu armazenamento, quer no momento do seu consumo. Nesse sentido, justifica-se a detecção da GBL em pós ou líquidos suspeitos de incluírem GHB. Esta interconversão varia com as condições físico-químicas da solução (pH, temperatura, concentração inicial, tempo de exposição aos fatores ambientais), podendo surgir, inclusivamente, com outros compostos associados, por reação da GBL com o etanol, por exemplo (Elian, 2001).

Em termos globais, a GBL converte-se na totalidade em GHB em minutos, sempre que esteja em solução alcalina forte (pH=12). Em contrapartida, em meio ácido e na presença de etanol é formado um subproduto denominado GHB etil éster, numa reação denominada alcoólise ou transesterificação (Hennessy *et al.*, 2004). Assim, a verificação da presença deste subproduto numa amostra de bebida suspeita poderá indicar a adição de GBL à mesma (Hennessy *et al.*, 2004).

Com características metabólicas e sintomas semelhantes ao GHB, a GBL apresenta uma ação mais prolongada e uma taxa de absorção mais rápida. O seu uso regular produz, igualmente, sintomas de dependência e os seus efeitos tóxicos são semelhantes aos do GHB (Smith *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Ricaurte e McCann, 2005).

O 1,4-butanediol é um álcool alifático que, tal como o GHB, é endógeno no corpo humano (Ricaurte e McCann, 2005). Apresenta a fórmula molecular $C_4H_{10}O_2$ e uma massa molecular de 90.12 u.m.a. (Couper e Marinetti, 2002). Encontra-se igualmente disponível em lojas de produtos dietéticos, com diversa nomenclatura associada, quer ao nível da designação química (butano-1,4-diol, butilenoglicol, 1,4-dihidroxibutano, diol 14B, sucol-B, tetrametilenoglicol e tetrametileno 1,4-diol) quer ao nível dos “nomes de rua” e designações comerciais: Amino Flex, Biocopia PM, BlueRaine, Bomb, Borametz, BVM, Cherry/Lemon FX, Dormir, Drop, Enliven, FUBAR, FX, Growth Hormone Release Extract (GHRE), Herbal GHB, Ink Jet Printer Fluid, Inner G, Liquid Gold, Midnight, Miracle Cleaning Products, Mystik, N Force, NRG 3, Pine Needle Oil or Extract, Promusol, Rejuv@Nite, Rest-Q, Revitalize Plus, Rush, Serenity, Soma Solutions, SomatoPro, Thunder Nectar, Ultradiol, Weight Belt Cleaner, White Magic Cleaner, X-12, e Zen (Couper e Marinetti, 2002; Ricaurte e McCann, 2005). Apesar da sua conversão laboratorial em GHB ser possível, esta é demasiado complexa e cara para ser realizada em laboratórios clandestinos (Couper e Marinetti, 2002). Após ingestão, o 1,4-butanediol é convertido em GHB por duas desidrogenases, nomeadamente a álcool-desidrogenase, que metaboliza a conversão do

1,4-butanediol em γ -butiraldeído, e a aldeído-desidrogenase, que metaboliza este composto intermédio em GHB, pelo que também neste caso o GHB é considerado como sendo a forma farmacologicamente ativa do 1,4-butanediol (Couper e Marinetti, 2002; Maxwell, 2005; Ricaurte e McCann, 2005; Richard *et al.*, 2005).

Contrariamente à GBL, o 1,4-butanediol não se encontra em estado de equilíbrio químico com o GHB ou a GBL, convertendo-se inteiramente em GHB com o tempo (Couper e Marinetti, 2002).

O 1,4-butanediol também é usado como suplemento dietético, apresentando efeitos tóxicos semelhantes aos do GHB e da GBL (Couper e Marinetti, 2002). Apresenta dois sintomas característicos: a incontinência urinária e fecal (Ricaurte e McCann, 2005).

A γ -Valerolactona (GVL) é um congénere do GHB, recentemente introduzida, sendo ainda escassa a informação, quer relativamente ao seu modo de ação quer relativamente aos seus efeitos (Anderson *et al.*, 2006).

3.2. EFEITOS FARMACODINÂMICOS

O GHB apresenta, primariamente, efeitos eufóricos, anestésicos e sedativos (Couper e Marinetti, 2002; Shima *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 2006). Nas primeiras pesquisas associadas à sua descoberta, a sua ação como depressor do SNC aparentava semelhanças com os designados “sedativos/hipnóticos” clássicos, nomeadamente benzodiazepinas e barbitúricos (Rodgers *et al.*, 2006). No entanto, atualmente alguns autores pretendem colocá-lo numa classe farmacológica separada, funcionando como neurotransmissor e neuromodulador diferenciado (Weir, 2000; Nicholson, 2001; Moriya e Hashimoto, 2004; Dimitrijevic *et al.*, 2005; Uys, 2005; Crunelli, 2006).

Este composto apresenta algumas possibilidades terapêuticas para a narcolepsia, cataplexia, fibromialgia e terapêutica de recuperação de alcoolismo crónico, com uma designação alternativa denominada de “oxibato sódico” de GHB, correspondente à sua forma de sal de sódio, para distinção no seu uso clínico. A utilização no tratamento do alcoolismo é sugerida por uma aparente eficácia em suprimir os sintomas de abstinência do álcool, aumentar o número de dias dessa mesma abstinência, reduzir o número de bebidas diárias e diminuir o sentimento de necessidade de consumo (McCusker, 1999; Weir, 2000; Smith *et al.*, 2002; Negrusz e Gaensslen, 2003; Britt and McCance-Katz, 2005; Frucht *et al.*, 2005; Struys *et al.*, 2006).

Mais recentemente tem sido estudada a sua utilização na terapêutica de desintoxicação de opiáceos (Weir, 2000; Britt and McCance-Katz, 2005). Os seus fins lícitos e de utilização terapêutica incluem o uso, em alguns países, em procedimentos anestésicos e de reanimação (Couper e Marinetti, 2002), e trabalhos paralelos estudam a sua possível atividade contrária à angiogénese induzida por células tumorais (Weir, 2000; Fukui *et al.*, 2003; Dimitrijevic *et al.*, 2005). Os primeiros estudos sobre o composto referiram, curiosamente, descrições prometedoras relativamente aos efeitos do GHB como anestésico (Couper e Marinetti, 2002).

A avaliação dos efeitos do GHB por eletroencefalograma revelou que o padrão cerebral elétrico é próximo do observado durante o estado fisiológico de sono. É nesta normalização do sono que se procura utilizar o GHB na terapêutica da narcolepsia (Couper e Marinetti, 2002). O GHB funciona como potenciador da fase *Rapid Eye Movement* (REM) e das fases 3 e 4 do sono, o que o distingue de outros sedativos-hipnóticos, como as benzodiazepinas e o álcool, cujos efeitos hipnóticos não “imitam” o sono normal, diminuindo, em paralelo, a fase REM do sono (Couper e Marinetti, 2002).

A administração controlada de GHB em estudos animais e em estudos de acompanhamento em humanos demonstrou poder ser um instrumento ativo no tratamento de alcoolismo, reduzindo o consumo de etanol pelos pacientes, bem como diminuindo a intensidade dos sintomas de desmame. No entanto, o próprio GHB pode causar uma nova dependência (Couper e Marinetti, 2002).

Alguns autores referem uma preocupação suplementar, já que poderá haver uma interação entre o GHB e alguns fármacos inibidores proteicos, como o *ritonavir*, utilizado na terapêutica de doentes com HIV/SIDA, com possibilidade de potenciação de um quadro de *overdose* (Rodgers *et al.*, 2004).

Os efeitos sintomáticos do GHB são semelhantes aos de uma intoxicação alcoólica. No entanto, comparativamente com o consumo de álcool, os episódios de perda de consciência são mais frequentes e imprevisíveis (Hopfer *et al.*, 2006). Os seus utilizadores descrevem sensações de euforia, relaxamento, sociabilidade potenciada, desinibição social e interesse sexual aumentado (Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Uys, 2005). Facilmente se depreende que são estes os sintomas que os consumidores de GHB procuram atingir, associados à potenciação sensorial e um contexto psicossocial que pode ser designado como “transcendência eufórica” (Weir, 2000). Outros efeitos agudos incluem vômitos, incontinência fecal, confusão mental, tonturas, nistagmo, ataxia, vertigens, visão turva, diminuição da visão periférica, suores

frios e transpiração excessiva, sonolência, perda de consciência, tremores, perdas e lapsos de memória, agitação, bradicardia, hipotermia, coma e morte (Weir, 2000; Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Zvosec e Smith, 2005; Crunelli, 2006).

Todos estes efeitos estão geralmente associados à dose consumida (Ricaurte e McCann, 2005), muito embora a resposta metabólica ao composto tenha características muito individualizadas, de consumidor para consumidor (Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004). Assim, as doses mais altas, com ou sem consumo simultâneo de álcool, levam a estados de confusão mental, hipoxia e depressão respiratória, vômitos e náuseas, sudorese excessiva, incontinência, ataxia, movimentos musculares involuntários, bradicardia, hipotermia, hipotensão, delírios, acidose respiratória aguda, agravamento da severidade do quadro de depressão respiratória e inconsciência, culminando em coma (Weir, 2000; Couper e Marinetti, 2002; Ricaurte e McCann, 2005). Note-se ainda que o consumo concomitante com álcool interfere com o metabolismo do GHB, potenciando o aumento da concentração deste no sangue, impedindo a sua metabolização e aumentando a possibilidade de um episódio grave de insuficiência respiratória (Rodgers *et al.*, 2004). Em paralelo, o GHB potencia os efeitos depressores do SNC provocados pelo etanol (Couper e Marinetti, 2002). Os seus efeitos depressores sobre o SNC, associados a uma impossibilidade de controlo total da dose consumida, conduzem quer a situações rápidas de *overdose*, que podem levar à morte, quer a uma rápida recuperação do consumidor, com uma passagem quase instantânea de um estado de coma profundo a um estado de alerta normalizado (Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Hopfer *et al.*, 2006).

Refira-se que este contexto de risco de efeitos adversos e/ou *overdose* é maioritariamente imprevisível, influenciado, para além do próprio contexto ilícito referido no parágrafo anterior, pelo pico de concentração no organismo rapidamente atingido e pela curva de dose-resposta íngreme, com alterações importantes na sintomatologia influenciadas por pequenas alterações na concentração (Elian *et al.*, 2001; Rodgers *et al.*, 2004).

O tipo de consumo ilícito mais comum associado a este composto cinge-se à procura da indução do sono pós-atividade social (Smith *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2004). Consequentemente, um dos efeitos de dependência mais referidos pelos consumidores é a insónia ou estado de alerta como ressaca. Assim, a rápida metabolização e eliminação do GHB leva ao aparecimento de insónias ao fim de duas ou três horas de sono. A situação é contornada com novas e mais altas doses de GHB,

consequência do efeito de tolerância ao composto (Rodgers *et al.*, 2004). Estão descritos valores diários de toma entre 25-100 g de GHB em utilizadores dependentes (Couper e Marinetti, 2002; Freese *et al.*, 2002).

Sendo uma substância que origina dependência física (Rodgers *et al.*, 2004), o processo de desabituação do GHB é longo (meses) e traz uma série de diferentes sinais de ressaca, comparáveis à síndrome de abstinência de benzodiazepinas (Hopfer *et al.*, 2006): ansiedade, tremores, insónia, náuseas e vômitos, diaforese, hipertensão, ataques de pânico, diarreia e taquicardia. Estão descritos casos de *delirium tremens* e estados de esquizofrenia devido a paragens súbitas de consumo sem qualquer controlo (Rodgers *et al.*, 2004). Para reverter e controlar os sintomas de abstinência, nomeadamente a agitação refratária, é sugerida a utilização de sedativos e anticonvulsivantes, bem como inibidores da produção de glutamato, tal como a gabapentina. Os sintomas de abstinência surgem muito rapidamente (1 a 6 horas após consumo) e podem prolongar-se por semanas ou mesmo anos (Couper e Marinetti, 2002; Freese *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Cook *et al.* 2006).

O GHB passou também a ter uma associação direta a diversos casos de violação. De facto, sendo facilmente dissolvido em bebidas, torna-se indetetável (inodoro, incolor e insípido), provocando na vítima perda de coordenação muscular, confusão, sedação, perda de consciência e amnésia (Couper e Marinetti, 2002; Freese *et al.*, 2002; Hopfer *et al.*, 2006). A questão associada à amnésia ainda não é consensual, já que alguns estudos efetuados em ratos demonstraram a inexistência desse tipo de ação, com consumo de GHB isolado ou acompanhado com etanol. É sugerido que a sensação amnésica associada ao GHB seja justificada pela rápida passagem de um estado de consciência a um estado de inconsciência profunda, incluindo o coma (Couper e Marinetti, 2002). Os níveis de intoxicação atingidos provocam uma incapacidade de resistência das vítimas, à qual se associa a rápida metabolização completa da substância, tornando difícil a deteção da mesma cerca de 12 horas após a ingestão (Britt e McCance-Katz, 2005).

Os efeitos clínicos e adversos são rapidamente observados após a ingestão de GHB, surgindo os primeiros efeitos entre 10 a 30 minutos após a ingestão, ao passo que a concentração mais alta no plasma surge 20 a 45 minutos após a ingestão. Os efeitos duram 2 a 5 horas e a recuperação após *overdose* ocorre entre 3 a 6 horas após consumo, estando, naturalmente, dependente da dose (Couper e Marinetti, 2002).

A intervenção clínica de emergência não possui, nos seus protocolos, um antídoto para o GHB, incluindo a abordagem terapêutica uma observação em cuidados intensivos e/ou intermédios, ventilação de suporte, se necessário, e atropina para situação clínica de bradicardia persistente (Weir, 2000).

A sintomatologia dos referidos precursores do GHB é muito semelhante à deste composto, o que pode ser justificado pela rápida transformação *in vivo* dos mesmos em GHB. Estes incluem alucinações, taquicardia, tremores, nistagmo e diaforese. Síndromes severos incluem quadros paranoides, alucinações, psicoses e instabilidade autónoma (Couper e Marinetti, 2002). Note-se que após investigação do potencial anestésico da GBL e do 1,4-butanediol se verificou que a GBL induz o sono mais rapidamente, ficando o GHB em segundo lugar e o 1,4-butanediol em terceiro. Esta hierarquia é justificável, já que, sendo a GBL mais lipofílica, é mais rapidamente absorvida. Em paralelo, como o 1,4-butanediol é metabolizado mais lentamente do que o GHB, existe, no seu processo de metabolização, um atraso nos seus efeitos (Couper e Marinetti, 2002).

O tratamento de desabituação inclui a toma de benzodiazepinas (Diazepam ou Lorazepam) ou, em alternativa, pentobarbital (Rodgers et al., 2004).

4. TOXICOCINÉTICA

4.1. ABSORÇÃO

O GHB encontra-se presente no soro e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Quando ingerido, é rapidamente absorvido, apresentando um tempo de meia-vida de 27 minutos (Weir, 2000). A sua absorção é um processo de capacidade máxima limitada, já que a doses aumentadas correspondem tempos mais longos até se atingir o pico máximo de concentração. Em contrapartida, está documentado que a absorção num estômago vazio, em humanos, é mais rápida. A absorção da GBL aparenta ser mais rápida do que a do GHB, já que aquela apresenta um comportamento mais lipofílico, o que a permite atravessar a membrana celular muito mais rapidamente do que o GHB. A absorção do 1,4-Butanediol é muito semelhante à do GHB, já que, tal como este, é um composto polar, ou seja, lipofóbico (Couper e Marinetti, 2002).

4.2. DISTRIBUIÇÃO

Os efeitos do GHB surgem 15 a 30 minutos após a ingestão e o pico de concentração é atingido sensivelmente 60 minutos após a ingestão (Weir, 2000; Elian, 2001; Couper e Marinetti, 2002; Gahlinger, 2004). O seu tempo de meia-vida corresponde a cerca de 30 minutos (Elian, 2001), apresentando uma duração estimada dos efeitos de uma dose que não ultrapassa as 4-6 horas (Couper e Marinetti, 2002; Uys, 2005).

A concentração de GHB no cérebro atinge o equilíbrio com outros tecidos em cerca de 30 minutos, atravessando o GHB a barreira placentária a uma taxa semelhante à da barreira hemato-encefálica. Em contrapartida, a distribuição pelo líquido cefalorraquidiano apresenta características de difusão passiva, já que o tempo de demora para atingir o equilíbrio é incomparavelmente superior (5 minutos no plasma, 10 minutos no cérebro, 170 minutos no líquido cefalorraquidiano) (Couper e Marinetti, 2002).

É proposto também que a GBL possa ter um caminho diferenciado do GHB, em termos de distribuição. Estudos de experimentação animal, em ratinhos, com administração de doses equivalentes de GHB e GBL, demonstraram que os níveis máximos no plasma eram mais elevados para o GHB, mas de duração mais longa para a GBL. Complementarmente, os níveis de GBL no músculo liso dos animais eram consistentemente mais elevados do que os níveis de GHB, o que sugere um sequestro de GBL no músculo liso antes da transformação desta em GHB. Sabendo que o músculo liso não contém a enzima lactonase, esta sugestão é perfeitamente concebível. Assim, posteriormente, a GBL seria de novo libertada na corrente sanguínea, com conversão em GHB (Couper e Marinetti, 2002).

4.3. METABOLISMO

O GHB é metabolizado em ácido 4-hidroxicrotónico ou semi-aldeído succínico e posteriormente em ácido succínico (Figura 3), através de β -oxidação ou oxidação por GHB-desidrogenase, respetivamente (Elian, 2001; Richard *et al.*, 2005).

A sua via metabólica predominante é a oxidação em semialdeído succínico por uma enzima citosólica dependente de NADP^+ denominada GHB-desidrogenase. Esta enzima encontra-se presente em diversos tecidos, nomeadamente cérebro, fígado,

coração, vesícula biliar, testículos e rim. Há uma segunda enzima, a GHB transhidrogenase, localizada na fração microssomal, que também efetua esta oxidação, podendo inclusivamente reverter esta reação (Couper e Marinetti, 2002).

O segundo passo metabólico é a oxidação do semialdeído succínico em ácido succínico, através de uma enzima dependente do NAD⁺ designada desidrogenase do semialdeído succínico. Após este passo, o ácido succínico entra no Ciclo de Krebs, sendo rapidamente metabolizado em CO₂ e H₂O, já que não estão descritos, por agora, metabolitos ativos do GHB (Couper e Marinetti, 2002; Smith *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2004).

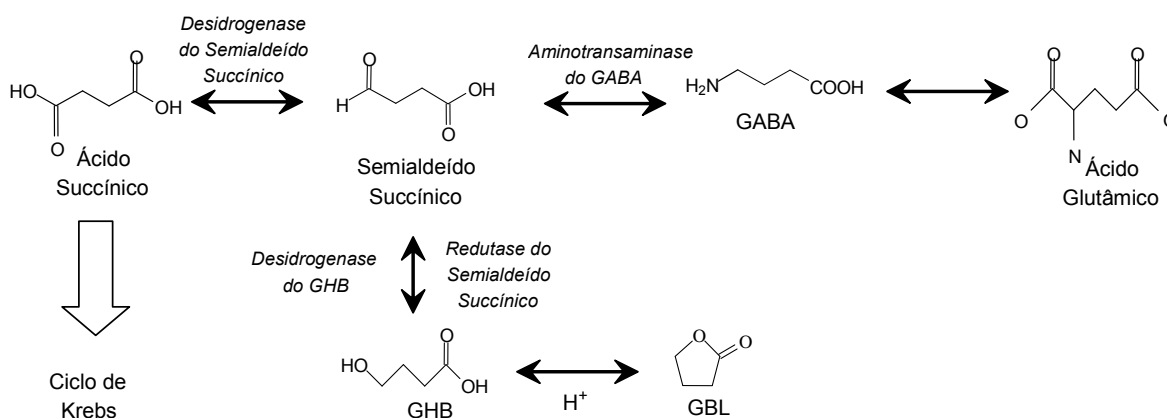


Figura 3 – Via metabólica de síntese e metabolismo do GHB (retirado de Couper e Marinetti, 2002).

Estudos recentes sugerem a possibilidade de utilização de metabolitos como biomarcadores de consumo de GHB. No entanto, até agora não eram conhecidos metabolitos glucoronizados do GHB. Em 2013, Petersen *et al.* publicaram um estudo descrevendo um novo metabolito denominado GHB-glucorónido (GHB-GLUC). Este composto foi testado em urina como biomarcador. No entanto, a variação individual entre voluntários demonstrou a impossibilidade de utilização deste composto para o desiderato proposto acima, já que a variação inter-individual era demasiado elevada. A falta de informação relativa a este composto é ainda um óbice à compreensão da efetiva importância do mesmo, sendo sugerida a necessidade de realização de diversos tipos de estudos para uma descrição e análise pormenorizada deste composto. Paralelamente, é sugerida a possibilidade deste metabolito ser a causa das variações de concentração de GHB ao longo do tempo, embora ainda não exista qualquer estudo comprovativo da premissa (Petersen *et al.*, 2013)

A GBL é rapidamente convertida em GHB, através de hidrólise catalisada por uma lactonase (Figura 4), sendo o tempo de semi-vida da GBL inferior a 1 minuto.

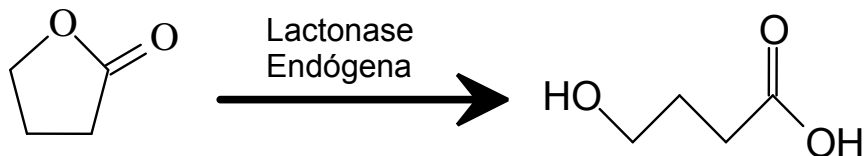


Figura 4 – Obtenção do GHB a partir da GBL (retirado de Couper e Marinetti, 2002).

O Metabolismo do 1,4-butanediol é caracterizado por ser uma conversão enzimática em dois passos, o que resulta num prolongamento de tempo até à obtenção da concentração máxima no plasma e um prolongamento no tempo de concentrações elevadas de GHB. A conversão pode ser atrasada ou inibida utilizando etanol, pirazole ou disulfiram (Couper e Marinetti, 2002).

O primeiro passo é dado por uma álcool-desidrogenase dependente de NAD^+ , com produção de γ -hidroxibutiraldeído (Figura 5). O segundo passo é dado através de uma aldeído-desidrogenase, com produção de GHB. Esta conversão pode ser feita no fígado, cérebro, rim e coração (Couper e Marinetti, 2002).

A análise da sequência metabólica acima descrita demonstra o efeito inibidor competitivo que o etanol exerce no metabolismo do 1,4-BD, justificando uma maior taxa de conversão do composto em GHB por parte do fígado (Couper e Marinetti, 2002).

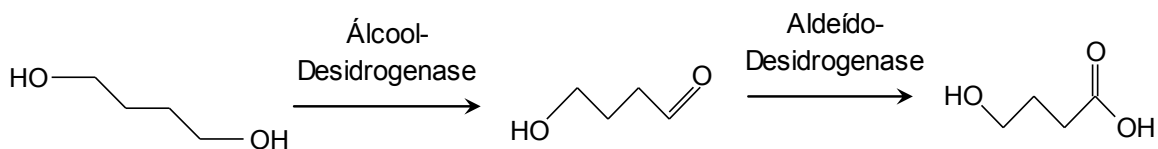


Figura 5 – Conversão do 1,4 – butanediol em GHB (retirado de Couper e Marinetti, 2002).

O GHB também pode surgir como metabolito de outras substâncias. O *florafur*, usado no tratamento do cancro do colon, é metabolizado no princípio ativo 5-fluorouracil, seguido de transformação em GHB e GBL, ao passo que o tetrahydrofurano sofre também uma transformação em GHB (Couper e Marinetti, 2002). A interação do GHB com substâncias medicamentosas é uma área ainda com pouca informação. Embora diversas substâncias estejam descritas como sendo inibidoras da GHB desidrogenase, nomeadamente valproato, etosuximida, salicilato, amobarbital, fenobarbital, barbitol, clorpromazina, fenitoína, disulfiram e cianeto, não é claro que todas estas influenciem, quando usadas em valores terapêuticos, a inibição do metabolismo do GHB de forma notória (Couper e Marinetti, 2002; Andresen *et al.*, 2010). Por exemplo, está demonstrado que o valproato pode bloquear a desidrogenase do semialdeído succínico, ao mesmo tempo que potencia a ação inibidora da GHB desidrogenase. Paralelamente, este composto aumenta a atividade da decarboxilase do glutamato, que produz GABA a partir do glutamato. No entanto, o valproato também inibe a GABA transaminase, bloqueando o aumento de GHB através desta via. Ou seja, parece existir aqui um equilíbrio de ação do valproato sobre a concentração do GHB no indivíduo. Assim, atualmente, não é assumida a influência direta de qualquer medicamento diretamente em valores altos de GHB na urina ou no sangue (Andresen *et al.*, 2010).

A literatura consultada descreve também um caso envolvendo a administração concomitante de oxibato de sódio e topiramato. Neste caso, a um doente com prescrição diária prévia de oxibato foi adicionada a prescrição de topiramato. Após a primeira dose, foi notado um aumento da concentração de GHB em 2,8 vezes, conduzindo a um estado de coma, que foi depois revertido e com rápida recuperação logo após a interrupção da prescrição de topiramato. Sendo este o único caso publicado, impõe-se a necessidade de realização de estudos farmacocinéticos que possam vir a confirmar ou excluir esta possibilidade de interação entre as duas substâncias (Weiss *et al.*, 2013).

4.4. ELIMINAÇÃO

A sua via principal de eliminação é o ar expirado, sob a forma de H_2O e CO_2 (Weir, 2000; Rodgers *et al.*, 2004). A cinética de eliminação é de ordem-zero, ou seja, limitada pela capacidade do organismo. Assim, o GHB não apresenta um verdadeiro tempo de meia-vida, já que este tempo está diretamente dependente da dose consumida

(Couper e Marinetti, 2002), sendo o GHB rapidamente eliminado. Mesmo com a administração de doses muito elevadas, como é o caso da utilização para abuso sexual facilitado, o GHB é praticamente indetetável no plasma em cerca de 8 horas e na urina até 12 horas. Tipicamente, menos de 1% da dose consumida é recuperada na urina, sugerindo um metabolismo hepático extenso (Couper e Marinetti, 2002).

5. PRODUÇÃO ENDÓGENA DE GHB

A produção endógena de GHB é uma dificuldade para a interpretação dos eventuais resultados quantitativos encontrados. A tentativa, por parte de diversos autores, em diferentes estudos, para definir valores de referência acima dos quais se pode afirmar que a quantidade de GHB encontrada numa determinada amostra é de origem exógena traduziu-se, até ao momento, no valor de 5 mg/L, para amostras de sangue, e 10 mg/L, para amostras de urina, em indivíduos vivos. Ressalve-se, mesmo assim, que dificilmente se encontrarão valores acima dos referidos 6-12 horas após o seu consumo (Couper e Marinetti, 2002; Elian, 2002; Anderson *et al.*, 2003; Elliott, 2004; Wood *et al.*, 2004; Marinetti *et al.*, 2005; Moriya e Hashimoto, 2005; Shima *et al.*, 2005).

A própria estabilidade química *in vivo* do GHB tem tendência a alterar-se ao longo do tempo e de acordo com a sua localização no organismo. Assim, tem uma tendência natural em co-existir em equilíbrio com a GBL, muito embora o organismo apresente alguns mecanismos que minimizam essa transformação, nomeadamente as lactonases endógenas. No entanto, se a matriz não possui essa enzima, como é o caso da urina ou o conteúdo gástrico, esse equilíbrio poderá ser atingido, estando tal transformação dependente do pH da mesma (Couper e Marinetti, 2002).

5.1. GHB ACIDÚRIA

A GHB acidúria é uma doença genética rara que resulta de uma falha na estrutura da semialdeído desidrogenase. Consequentemente, dá-se uma acumulação de GHB no organismo devido a uma via metabólica alternativa, com a redução do semialdeído succínico, efetuada por uma redutase do semialdeído succínico dependente do NADPH. Nos indivíduos portadores desta desordem genética, os valores de GHB encontrados são bastante superiores ao normal (acima dos 200 mg/L na urina, por

exemplo) podendo indicar, erradamente, um consumo de GHB que nunca existiu. Assim, em casos positivos esta hipótese deve ser descartada. Para tal, é sugerida a realização de uma segunda análise ao examinado, para a verificação dos valores basais de referência (Kerrigan, 2002; Elliott, 2003; Shima *et al.*, 2005).

Capítulo II – GHB – Consumo e Contextualização Forense

1. PREVALÊNCIA E PADRÕES DE CONSUMO ATUAIS

A representação da prevalência e do padrão de consumo ilícito de qualquer substância está sempre associada à credibilidade e representatividade das fontes de informação e dos dados disponíveis, nomeadamente quando essa informação é obtida maioritariamente por entrevista a consumidores. Assim, e no que diz respeito ao GHB, qualquer documento referindo o consumo deste composto não permitirá, possivelmente, uma distinção relativa ao consumo dos seus precursores, já que o próprio consumidor não faz essa mesma distinção (EMCDDA, 2008).

As referências ao consumo de GHB são relativamente escassas no espaço europeu, embora alguns grupos específicos, quer em termos sociais, quer em termos geográficos, apresentem um consumo mais generalizado (EMCDDA, 2008). Em 2003 foi realizado, pela primeira vez, um grande estudo sobre o consumo de GHB a nível europeu em ambiente escolar, em 28 países, tendo os resultados demonstrado que, na faixa etária dos 15-16 anos, poucos indivíduos referiam ter tido contacto com o composto, nomeadamente 0,5 a 1,4% do total. Em contrapartida, inquéritos em ambientes específicos e grupos-alvo apresentam resultados diferenciados. Em ambiente de clube de dança ou outros grupos específicos, as prevalências de consumo já atingem outros valores, de 3 a 19%. Ficou então evidenciado um padrão de consumo específico associado a este grupo de compostos, sendo, no entanto, de ressaltar que, nos estudos consultados e publicados não foi considerado o consumo com outros fins que não os recreativos, nomeadamente a utilização para relaxamento pós-evento ou a automedicação para tratamento de sintomatologia de consumo e de abuso de outras substâncias, como o etanol (EMCDDA, 2008).

O GHB, e respetivos precursores, não é normalmente utilizado por indivíduos que fazem o primeiro contacto com tomas de substâncias ilícitas. Este contexto é sugerido pela assunção, por parte dos próprios, de efetivação de contacto prévio com outras substâncias, bem como por uma idade média de primeiro contacto superior à idade média de outros grupos de substâncias ilícitas (EMCDDA, 2008).

Em Portugal, as autoridades competentes, nomeadamente a Polícia Judiciária, não descrevem, nos seus relatórios anuais relativos ao combate ao tráfico de

estupefacientes, qualquer apreensão de GHB desde 2000, o que poderá indicar que o seu consumo pode estar dependente das possibilidades de utilização da GBL como precursor, sabendo-se que esta é uma substância não controlada (Polícia Judiciária, 2013).

Em contrapartida, observando o contexto europeu, incluindo os 28 países da União Europeia, a Turquia e a Noruega, o cenário já é diferente. De facto, desde 2004 que existem registos de apreensões em diversos países europeus, tanto de GHB, como de GBL e de 1,4-butanediol (1,4-BD) (EMCDDA, 2014). A informação relativa às apreensões considera diferentes unidades de massa e volume, consoante os compostos tenham sido apreendidos no seu estado líquido ou no seu estado sólido, pelo que são apresentados valores em Kg e em Litros (L) (Tabela).

Tabela 1 - Apreensões de GHB, GBL e 1,4-BD, por ano (adaptado de EMCDDA, 2014)

Ano	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
GHB (Kg)	20,332	53,83	13,677	33,4	9,7	31,774	21,1	0,91	10,7
GHB (L)	4,3	115,945	113,3	293,6	213,5	189,6	112,4	618,743	383,82
GBL (Kg)	0	0	0	37,89	0	0	18	14,3	6,358
GBL (L)	5,4	2,46	14,4825	49,206	873,253	252,325	460,7	1200,51	630
1,4-BD (L)	45,3	7,4	18,1	0	0	0	0	0	0

Relativamente ao GHB e à GBL, é de notar que a existência de apreensões é uma realidade transversal a todos os anos, verificável nos gráficos das figuras 6 e 7:

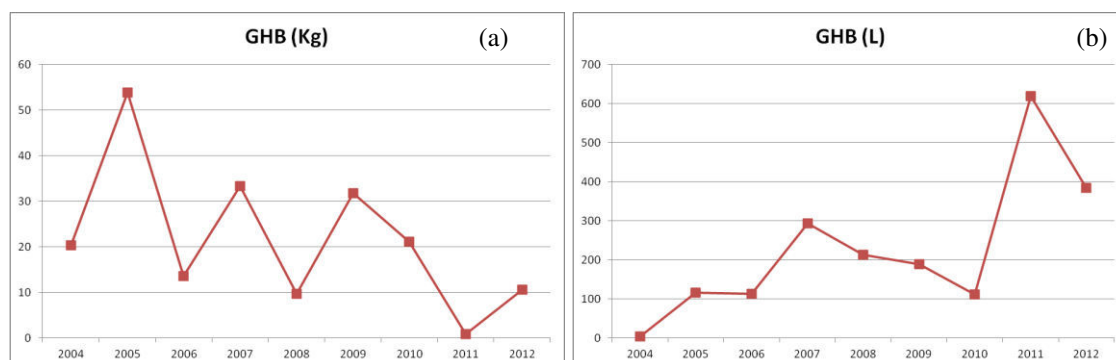


Figura 6 - Apreensões de GHB entre 2004 e 2012, em Kg (a) e em L (b) (adaptado de EMCDDA, 2014).

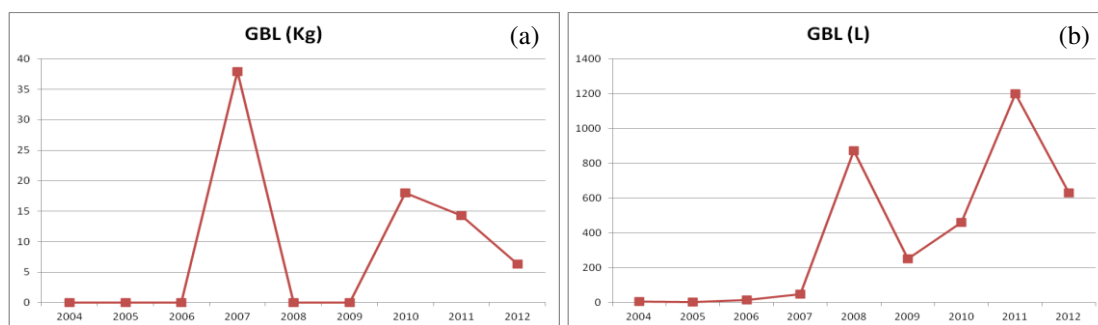


Figura 7 - Apreensões de GBL entre 2004 e 2012, em Kg (a) e em L (b) (adaptado de EMCDDA, 2014).

Quanto ao 1,4-BD, destaca-se o facto de não existir qualquer apreensão registada desde 2007. A provável razão para esta realidade pode residir no facto da transformação deste em GHB ser um processo mais complexo e moroso do que a transformação da GBL em GHB. Considerando que ambos os precursores são legais, não será de admirar que os produtores clandestinos escolham a via mais fácil, rápida e económica de se obter o composto ilícito alvo.

Devido aos seus efeitos relaxantes, o GHB é utilizado como indutor do sono após o consumo de estimulantes e participação numa *rave party* (Rodgers *et al.*, 2004; Ricaurte e McCann, 2005; Struys *et al.*, 2006). Maioritariamente associado ao ambiente *rave*, o seu uso tornou-se popular devido à falsa ilusão de segurança. Aumentando o conhecimento sobre os efeitos desta substância e sobre a sua toxicidade, tornou-se comum como uma *club drug*, sozinha ou associada ao álcool. Associação esta que se torna especialmente perigosa pelo efeito sinérgico do etanol e do GHB, já que apresentam um perfil farmacológico semelhante (Nicholson e Balster, 2001; Smith *et al.*, 2002; Wood, 2004; Britt e McCance-Katz, 2005; Dimitrijevic *et al.*, 2005; Crunelli *et al.*, 2006; Sassenbroeck *et al.*, 2007).

A sua utilização associada a outras drogas é também relativamente comum, tendo como objetivo prolongar no tempo o efeito dessas mesmas substâncias, nomeadamente a MDMA, cocaína, metanfetamina, LSD, canabinóides e etanol (Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; EMCDDA, 2008). A combinação de GHB com MDMA é das mais populares, procurando e obtendo os efeitos desejados de ambos, com minimização ou, pelo menos, atraso no tempo dos efeitos indesejados (Couper e Marinetti, 2002; Smith *et al.*, 2002; Uys *et al.*, 2005; Crunelli *et al.*, 2006; Sassenbroeck *et al.*, 2007).

Paralelamente, surgiram descrições da utilização do GHB, associado ou não ao álcool, em casos de crimes sexuais (McCusker *et al.*, 1999; Elian *et al.*, 2001; Freeze *et al.*, 2001; Nicholson e Balster, 2001; Couper e Marinetti 2002; Negrusz e Gaensslen, 2003; Britt e McCance-Katz, 2005; Ricaurte e McCann, 2005; Anderson *et al.*, 2006). Embora vários estudos tenham sido realizados nas últimas décadas, a dificuldade de comprovar a presença do composto, devido ao seu rápido tempo de metabolização, traduziu-se num número de casos limitado onde a utilização deste grupo de substâncias ficou evidenciada (EMCDDA, 2008). Um caso descrito na literatura apresentou um valor de 15 mg/L na urina de uma alegada vítima de agressão sexual, surgindo como primeira sugestão para um valor de referência, justificando assim a sua deteção sempre que surja um caso de suspeita (Elian, 2000).

A proibição da sua venda não impediu o aumento contínuo da sua disponibilidade nas ruas, bem como em sítios da internet. Os seus nomes de rua passaram a ser variados: liquid X, ecstasy líquida, GHB, Grievous Bodily Harm, scoop, soap, cherry meth, G, entre outros (McCusker *et al.*, 1999; Nicholson e Balster, 2001; Smith *et al.*, 2002; e Gaensslen, 2003; Hopfer *et al.*, 2006). A semelhança dos seus efeitos, quando comparados com os efeitos provocados pela MDMA, levou à adopção da designação de *ecstasy* líquida (Uys e Niesink, 2005).

2. LEGISLAÇÃO

Conforme é usual na abordagem associada às políticas de controlo e posterior criminalização de utilização ilícita de substâncias com efeitos psicoativos, o GHB começou por ser uma substância de utilização terapêutica. Inicialmente classificado como alimento e suplemento dietético (Couper e Marinetti, 2002), posteriormente, e conforme referido anteriormente, os sucessivos casos de utilização abusiva, com consequente verificação e descrição de efeitos adversos, de curto e longo prazo, conduziram à classificação da substância como substância controlada, desde o final do século XX.

Em Novembro de 1990, a Federal Drug Administration (FDA) proibiu a venda do GHB sem receita médica e o composto passou a ser controlado, desde 1999, no Reino Unido (Richard *et al.*, 2005); desde 2000 nos Estados Unidos da América e desde 2001 no Japão (Shima *et al.*, 2005). A nível europeu, Portugal incluído, o GHB está “sob vigilância” desde o ano 2000, e desde 2001 que foi incluído no anexo IV da

Convenção das Nações Unidas para as Substâncias Psicotrópicas, tornando-se, assim, obrigatório para todos os países signatários, nomeadamente os da União Europeia, o controlo da substância, devendo estes incluir o GHB na legislação própria nacional referente às substâncias psicotrópicas (Hennessy *et al.*, 2004; Rodgers *et al.*, 2004, EMCDDA, 2008).

Em Portugal, a Lei 15/93, de 22 de Janeiro, regulamenta e descreve os compostos que apenas podem ser transacionados de forma controlada, procurando obviar o drama social e o apetite financeiro que representa o tráfico de substâncias ilícitas. A listagem de compostos-alvo foi sofrendo sucessivas atualizações, sendo a mais atual a correspondente à Lei 22/2014, de 28 de Abril, correspondendo à sua 22^a alteração. O GHB foi incluído nesta mesma lista na alteração publicada na Lei 17/2004, de 17 de Maio. Foi incluído na tabela II-A, correspondente a compostos controlados que poderão, no entanto, ser utilizados em ação clínica (Lei 15/93, de 22/01, atualizada na redação da Lei 17/2004, de 17 de Maio).

Disponível em diversos países europeus como anestésico e agente hipnótico, o GHB não apresenta atualmente qualquer uso terapêutico autorizado nos E.U.A., à exceção do uso como “substância investigacional” para o tratamento da narcolepsia (Couper e Marinetti, 2002).

Contrariamente ao GHB, a GBL, genericamente, não é uma substância controlada, em parte devido ao seu uso disseminado em meio industrial, à exceção de alguns países da União Europeia, nomeadamente Itália, Letónia e Suécia, que incluíram a GBL e o 1,4-BD nas listas que legislam as substâncias psicotrópicas controladas (EMCDDA, 2008). Assim, torna-se importante ressaltar-se a possibilidade desta ser vendida de forma legal, podendo ser obtido GHB após uma simples alteração de pH da solução. Desse modo, a compreensão do comportamento da GBL em meio aquoso, para verificação da sua capacidade de conversão em GHB, é fulcral para uma política de deteção mais eficaz por parte das forças policiais (Hennessy *et al.*, 2004).

3. FORMAS DE CONSUMO

O GHB apresenta-se como líquido, pó branco, cápsulas ou tabletes (Couper e Marinetti, 2002). Nos ambientes de consumo, o GHB é normalmente disponibilizado em solução salgada e transparente, sendo tomado através de colher de chá ou usando como medida a própria tampa do frasco. A sua cor transparente pode ser ultrapassada

com a diluição em líquidos corados, a fim de ser distinguido da água, ao passo que o seu sabor salgado, considerado desagradável para alguns dos seus consumidores, é ultrapassado com a adição a sumos ou bebidas alcoólicas com sabores intensos (Couper e Marinetti, 2002; Freese *et.al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Cook *et al.*, 2006). A quantidade de composto numa colher de chá é imprevisível, podendo variar entre os 500 mg e os 5 g por dose. Tal discrepância pode trazer efeitos imprevisíveis aos consumidores habituais que mudam frequentemente de fornecedor ou de preparação (Freese *et al.*, 2002; Couper e Marinetti, 2002; Rodgers *et al.*, 2004).

O protagonismo que os meios de comunicação social atribuíram ao GHB como “droga da violação”, conduziu a uma atenção redobrada sobre o modo de utilização do composto, nomeadamente através da adição sub-reptícia do mesmo a bebidas (*drink spiking*). No entanto, os dados recolhidos em contexto forense apontam para o álcool como a substância mais comum neste contexto ilícito, muito embora a tipificação metabólica do GHB e dos seus próprios precursores dificulte, em elevado grau, a possibilidade de deteção em tempo útil da sua presença na vítima, pelo que é possível que a incidência real seja superior aos números oficiais reportados (EMCDDA, 2008).

4. DETERMINAÇÃO/APARECIMENTO DE GHB *POSTMORTEM*

A formação *postmortem* de GHB é igualmente um problema a considerar, já que se sabe que este continua a ser produzido após a morte do indivíduo. É sugerido que essa produção seja resultado do normal processo de decomposição celular, com a conversão enzimática do ácido succínico, do GABA e da putrescina (também designada por 1,4-butanediamina, poliamina presente nas células eucariotas com papel ativo na proliferação e diferenciação celular), culminando numa metabolização total do composto, caso esta cadeia metabólica se esteja a dar por ação bacteriana. As concentrações encontradas em amostras *postmortem* chegam a atingir valores muito elevados, o que dificulta muito a correta interpretação dos mesmos (Couper e Marinetti, 2002). Moriya e Hashimoto (2004) sugerem que as bactérias intervenientes no processo poderão metabolizar a glicose em ácido succínico, através do fosfoenolpiruvato e do oxaloacetato, com passagem para a via metabólica do GHB. Outros estudos sugerem, inclusivamente, que a produção microbiana de GHB pode ser específica de algumas estirpes selecionadas, nomeadamente *pseudomonas spp*, aumentando a dificuldade na interpretação dos resultados obtidos, já que à partida estas estirpes podem estar (ou não)

presentes nas amostras analisadas (Elliott, 2004; Elliott *et al.*, 2004; Moriya e Hashimoto, 2004; Marinetti *et al.*, 2005; Beránková, 2006; Fjeld *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm evidenciado que o surgimento destes valores muito elevados pode ser influenciado pelas condições de amostragem e armazenamento e inclusivamente pela especificidade das técnicas analíticas usadas. De facto, diferentes grupos de trabalho foram demonstrando que a presença ou ausência de produtos preservantes na amostra, bem como a temperatura de armazenamento, influenciam de forma decisiva a produção *postmortem* de GHB e o aumento da sua concentração ao longo do tempo (Elliott *et al.*, 2004; Moriya e Hashimoto, 2004). Complementarmente, a produção *postmortem* de GHB não se cinge apenas ao sangue mas também a outras amostras, como a urina e o humor vítreo, se bem que em proporções e quantidades inferiores (Elliott *et al.*, 2004; Kintz *et al.*, 2004; Beránková *et al.*, 2006; LeBeau *et al.*, 2007).

A conversão do ácido succínico surge após o bloqueio do ciclo de Krebs, logo após a morte. Com este bloqueio, a concentração de ácido succínico aumenta e, consequentemente, as enzimas descritas acima transformam-no, sequencialmente, em semialdeído succínico e GHB, respetivamente (Couper e Marinetti, 2002). A conversão do GABA surge após libertação deste por parte de vesículas armazenadoras do composto, fruto do natural processo de decomposição. A transaminase do GABA converteria este em semialdeído succínico, passando de seguida a GHB. Estes processos podem ser bloqueados por ação de radiação de micro-ondas, que desnaturam as referidas enzimas (Couper e Marinetti, 2002).

A terceira, e sugerida como mais provável, origem de GHB *postmortem* é a conversão da putrescina. Foi demonstrado que se forma GABA a partir da putrescina, quer em órgãos quer no SNC de vertebrados. Esta conversão dá-se em dois passos, envolvendo a diamina-oxidase e a aldeído-desidrogenase, formando-se GABA. Órgãos que não contenham grande atividade de diamina oxidase têm um caminho alternativo, com a conversão da putrescina em monoacetilputrescina, através da poliamina aminotransferase da acetilcolina. Sendo sabido que a monoacetilputrescina é um substrato para a monoamina oxidase, a ação desta última, seguida pela aldeído-desidrogenase e pela acetilpoliamina-desacetilase, conduzem à formação do GABA (Couper e Marinetti, 2002).

As concentrações encontradas em amostras *postmortem* chegam a atingir valores elevados, o que dificulta muito a interpretação correta dos mesmos. Acredita-se, no

entanto, que esta produção possa ser minimizada com a recolha da amostra de sangue total para um contentor contendo fluoreto de sódio 1-5% e posterior armazenamento no frio, preferencialmente a -20°C. Nesse sentido, é também proposto um valor de *cut-off* de 30 mg/L e de 10 mg/L para amostras *postmortem* de sangue e de urina, respetivamente, desde que não sejam detetados sinais de putrefação avançada. Os valores mais baixos encontrados na urina poderão estar associados a uma menor presença de enzimas e de GABA, assim como a uma diminuição na capacidade de sobrevivência das estirpes de microrganismos envolvidos no processo. Dois estudos de armazenamento em congelação a longo prazo (até 50 meses) demonstraram a ausência de alterações significativas na concentração de GHB em diversos tipos de amostras, ao longo do tempo, a partir do momento em que as mesmas são armazenadas. Richard *et al.* (2005) sugerem que a possibilidade de produção *postmortem* de GHB poderá ter um padrão, que pode ser idealmente utilizado na determinação mais precisa do intervalo *postmortem*, informação valiosíssima para o diagnóstico diferencial médico-legal (Richard *et al.*, 2005). Em alguns estudos, foi inclusivamente demonstrada uma correlação positiva entre o aumento do tempo *postmortem* (intervalo de tempo entre a morte e a colheita de amostras) e a quantidade de GHB encontrada nas mesmas (Skopp, 2004; Elliott *et al.* 2004; Moriya e Hashimoto, 2004; Richard *et al.* 2005; Maxwell, 2005; Marinetti *et al.* 2005).

Em contrapartida, em mortes não relacionadas com o consumo de GHB não foi ainda detetada qualquer relação entre a causa de morte e a concentração de GHB determinada nas amostras *postmortem*, quer para urina quer para sangue total (Elliott, 2004).

5. GHB COMO MARCADOR DO INTERVALO *POSTMORTEM*

A maior parte dos estudos controlados de produção de GHB *postmortem* em amostras biológicas avaliou, de alguma forma, o progresso e o comportamento do composto *in vitro*, procurando entender quais as vias possíveis para essa mesma produção e, paralelamente, procurar algum padrão de comportamento ao longo do tempo dessa mesma produção, nomeadamente com o estudo das diferentes condições possíveis de armazenamento. Em contrapartida, existe muito pouca informação relativa ao comportamento do composto *postmortem*, mas previamente à recolha das amostras da vítima. No entanto, alguns estudos tentaram abordar a avaliação do GHB como

possível marcador de determinação do intervalo *postmortem* (PMI). Richard e colaboradores desenvolveram um estudo de aplicação em ratinhos (n=4), onde ficou demonstrado um aumento linear de GHB em amostras de cérebro e sangue total nas primeiras 104 horas (5 dias), amostras essas recolhidas de doze em doze horas, à exceção do 1º dia, em que foram recolhidas de 6 em 6 horas (Richard *et al.*, 2005).

Elliott *et al.* (2004) sugerem, em contrapartida, através de um estudo debruçado sobre amostras putrefactas (escolhidas após observação morfológica e a presença de compostos indicadores da putrefação), que o nível de putrefação não apresenta uma relação proporcional com o valor de GHB para cada amostra (Elliott *et al.*, 2004).

Complementarmente, Busardo *et al.* (2014) avaliaram três conjuntos de amostras (n=10 para cada) divididos de acordo com o PMI, tendo descrito um comportamento crescente relativamente à concentração de GHB, associado ao aumento do referido PMI, até um máximo de 142 horas. Por outro lado, Andresen-Streichert *et al.* (2015) não encontraram diferenças estatisticamente significativas na avaliação efetuada a um conjunto de casos reais, no que ao PMI diz respeito.

Desse modo, a ausência de um consenso de referência, torna fundamental a descrição e caracterização de padrões de comportamento do GHB em amostras *postmortem*, antes e depois da recolha das mesmas a partir da vítima, a fim de se averiguar da possibilidade da concentração de GHB poder ser usada como elemento diferenciador ou coadjuvante para a determinação, o mais precisa possível, do PMI.

Capítulo III – Determinação de GHB em Amostras Biológicas: Sangue, Urina e Cabelo.

1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

1.1. SANGUE

O sangue é uma das matrizes biológicas mais apropriadas para a identificação de compostos tóxicos e, especialmente, para a análise quantitativa dos mesmos, pois o sangue é a matriz que melhor reflete a correlação entre a concentração do tóxico e os seus efeitos. São diversas as substâncias que podem ser detetadas no sangue, tanto no vivo como no cadáver, tais como álcool, medicamentos, drogas de abuso, pesticidas, entre outras. O sangue é, pois, considerada a matriz de eleição para a abordagem analítica associada à toxicologia forense, uma vez que se trata de uma matriz relativamente homogênea, onde os parâmetros fisiológicos variam apenas dentro de limites muito estreitos (Huestis e Cone, 1998; Teixeira, 2008).

As vantagens desta amostra consistem na possibilidade de se efetuarem identificações e quantificações numa única matriz (Moeller *et al.*, 1998). O sangue permite também, na maior parte dos casos, detetar o composto-alvo inalterado, bem como eventuais metabolitos, mais ou menos relevantes, já que todos podem ser detetados logo após a sua administração, ainda antes do seu metabolismo e/ou eliminação, ou nos diversos tempos e passos da via metabólica (Tarelho, 2003; Teixeira, 2008).

O sangue é ainda considerado a melhor amostra biológica para exames de confirmação, uma vez que a presença das substâncias nesta amostra é mais representativa de um consumo recente e consequente estado de influenciado (Teixeira, 2008).

Apresentando, em termos de consumo, um tempo de semi-vida de cerca de 30 minutos, a deteção de GHB no sangue ou em plasma é um processo complexo, sendo fundamental uma rápida recolha da amostra (Elian, 2001; Wood *et al.*, 2004; Maxwell, 2005).

Assim, embora as concentrações de origem endógena no sangue se encontrem inicialmente na gama dos ng/mL, diversos estudos que procuraram descrever e compreender o comportamento do composto sugerem, como valores de referência para amostras com consumo exógeno, o valor de 10 mg/L para amostras de sangue e para amostras de urina. A utilização destes valores de referência implica que ambas as amostras tenham origem *in vivo*. Note-se que, em condições excepcionais de amostragem, estes valores de referência poderão ser diminuídos. Independentemente disso, a rápida taxa de metabolismo e excreção de GHB leva a que valores superiores aos referidos já não sejam detetados entre 6 e 12 horas depois da toma. Ressalve-se que o pré-tratamento das amostras poderá permitir a diminuição dos valores encontrados no sangue (Kerrigan, 2002; Wood *et al.*, 2004, Shima *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006; LeBeau *et al.*, 2007; De Paoli *et al.*, 2011; Zörntlein *et al.*, 2012).

Kintz *et al.* (2004) sugerem que o sangue periférico é a amostra ideal, já que está menos sujeito a interferências *postmortem*, nomeadamente síntese *postmortem*, do que o sangue cardíaco.

A análise da tabela 2 permite verificar que a maioria dos métodos publicados para a deteção de GHB em sangue total, soro ou plasma, se baseia em procedimentos de extração líquido-líquido. Esta preferência será justificada pela simplicidade das metodologias, não sendo necessária a utilização de cartuchos de extração em fase sólida, com as desvantagens que estes poderiam trazer, quer em termos de custos, quer em termos de produção de resíduos. Assim, quase 80% das metodologias publicadas e consultadas (24 em 31) sugerem a utilização deste tipo de extração para aplicação às amostras biológicas. As alternativas sugeridas apontam a SPE (5 em 31) e a precipitação proteica, com ou sem diluição da amostra (2 em 31).

A possibilidade de utilização de “*dried blood spots*” capilares é uma possibilidade recente. O estudo desenvolvido por Sadones e colaboradores sugere a possibilidade da concentração de GHB determinada neste tipo de amostra ser representativa da concentração em amostra de sangue total com origem *in vivo*. Seria uma possibilidade interessante, pelo que representaria em termos de facilidade, diminuição do nível intrusivo da recolha e rapidez na obtenção de amostra (Sadones *et al.*, 2015).

Tabela 2- Métodos de detecção e quantificação de GHB em sangue.

Ref. ^a	Ano	Volume de amostra	Padrão Interno	Técnica Analítica	Extração	Derivatização	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Gama de Trabalho	Recuperação
Kalasinsky <i>et al.</i>	2001	50 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS IT SCAN mode	SPE	BSTFA:TMCS (99:1)	1 mg/L	1 mg/L	0,01 – 100 mg/L	80-85%
Elia	2002	100 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	n.a.	10 – 1000 µg/dL	n.d.
Mazarr-Proo <i>et al.</i>	2002	500 µL	GHB-d6	GC-MS PCI Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,2 mg/L	0,4 mg/L	n.a.	n.d.
Villain <i>et al.</i>	2003	20 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,1 mg/L	1 mg/L	1 – 200 mg/L	n.d.
Chen <i>et al.</i>	2003	100 µL (P)	GHB-d6	GC-PCI-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA	n.a.	2,5 mg/L	2,5 – 250 mg/L	43,5%
Elliott	2003	100 µL	Ácido Hexanóico	GC-FID	LLE	conversão em GBL	2,5 mg/L	n.a.	n.a.	n.d.
Elliott	2003	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	0,2 mg/L	1 – 10 mg/L	n.d.
Moriya e Hashimoto	2004	1 mL (ST)	α-metileno-GBL	HS-GC-FID	LLE	conversão em GBL	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 – 83 mg/L	n.d.
Elliott <i>et al.</i>	2004	100 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.
Elliott	2004	100 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	1 mg/L	n.a.	n.d.
Elliott	2004	100 µL (ST)	GHB-d6	GC-FID	LLE	conversão em GBL	n.a.	1 mg/L	n.a.	n.d.
Brenneisen <i>et al.</i>	2004	2 mL (P)	γ-valerolactona	GC-MS Quad SIM mode	LLE	Não	0,2 mg/L	0,5 mg/L	0,2 – 200 mg/L	n.d.
Kintz <i>et al.</i>	2004	20 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	1 mg/L	1 – 200 mg/L	n.d.
Marinetti <i>et al.</i>	2005	200 µL (P)	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE + SPE	BSTFA:TMCS (99:1)	5 mg/L	5 mg/L	5 – 150 mg/L	n.d.
Shima <i>et al.</i>	2005	200 µL	Ácido Hidroxipróico (HCA)	GC-MS Quad SCAN/SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,003 mg/L (SIM mode)	0,003 mg/L (SIM mode)	0,003 – 3 mg/L	63%
Richard <i>et al.</i>	2005	1 mL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	SPE	MTBSTFA/ACN (1:3)	0,027 mg/L (SIM mode)	0,089 mg/L (SIM mode)	0,1 – 5 mg/L	52,5%
Beránková <i>et al.</i>	2006	100 µL (S)	Ácido Adípico	GC-MS Quad SIM mode	LLE	MSTFA	3 mg/L	3 mg/L	0 – 200 mg/L	n.d.
Beránková <i>et al.</i>	2006	100 µL (ST)	Ácido Adípico	GC-MS Quad SIM mode	LLE	MSTFA	3 mg/L	3 mg/L	0 – 150 mg/L	n.d.
Paul <i>et al.</i>	2006	50 µL	GHB-d6	GC-MS/MS IT MRM mode	LLE	BSTFA	0,01 mg/L	2,5 mg/L	2,5 – 100 mg/L	90%
Dresen <i>et al.</i>	2007	100 µL (S)	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad MRM mode	LLE	Não	n.a.	1 mg/L	0 – 200 mg/L	n.d.
Andresen <i>et al.</i>	2010	100 µL (S)	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	ACN + [BSTFA:TMCS (99:1)] (2:1)	0,5 mg/L	0,6 mg/L	2 – 12 mg/L	30%
Al-Samarraie <i>et al.</i>	2010	n.a. (ST)	n.a.	GC-FID	LLE	conversão em GBL	1,9 mg/L	4,9 mg/L	5,2 – 103 mg/L	30%
Kugelberg <i>et al.</i>	2010	n.a. (ST)	γ-valerolactona	GC-FID	LLE	conversão em GBL	2 mg/L	8 mg/L	8 – 1000 mg/L	80%
Johansen <i>et al.</i>	2011	200 mg (ST)	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad MRM mode	Precipitação proteica e diluição 10X	Não	n.a.	1 mg/Kg	1 – 100 mg/Kg	88%
Zömllein <i>et al.</i> , Fjeld <i>et al.</i>	2012	200 µL (ST / S)	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	Acetato de etilo + [MSTFA/ITMS (99:1)] (1:1)	0,004 mg/L (Metanol) 0,08 mg/L (soro)	0,013 mg/L (Metanol) 0,30 mg/L (soro)	0,005 – 0,1 mg/L (Metanol) 0,09 – 5,09 mg/L (soro)	50,5%
Aromatario <i>et al.</i>	2012	250 µL (ST)	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	10 mg/L	10 mg/L	20 – 500 mg/L	n.d.
Dahl <i>et al.</i>	2012	100 µL (ST)	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad (ESI +) MRM mode	SPE	Não	0,65 mg/L	1,3 mg/L	2,6 – 312,3 mg/L	>97%
Lott <i>et al.</i>	2012	100 µL (S)	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad MRM mode	LLE	Não	0,7 mg/L	3,4 mg/L	2 – 50 mg/L	> 97%
Sørensen <i>et al.</i>	2012	200 µL (ST)	GHB-d6	UPLC-MS/MS Triple Quad ESI SRM mode	SPE	Não	0,5 mg/L	n.a.	5 – 200 mg/L	> 97%
Grennier <i>et al.</i>	2012	200 µL (ST)	-	Ensaio Imunoenzimático	Precipitação proteica	Não	1,3 mg/L	4,5 mg/L	n.a.	n.a.

LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação; LLE – Extração Líquido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; n.a. – não aplicável; n.d. – não divulgado; P – plasma; S – soro; ST – Sangue total.

1.2. URINA

A urina constitui o principal líquido de excreção do organismo, sendo considerada uma das matrizes biológicas apropriadas para a identificação e análise quantitativa não só dos compostos tóxicos mas também dos seus metabolitos. A urina humana é constituída principalmente por água (98%, em média), contendo igualmente ureia, ácido úrico, creatinina, iões (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) e outras substâncias (Guyton, 1991; Teixeira, 2008).

A urina foi das primeiras amostras biológicas a ser utilizada para a deteção de uma grande diversidade de substâncias, devido às elevadas concentrações dos compostos e/ou dos seus metabolitos aí presentes, bem como pela sua facilidade de colheita. É geralmente uma amostra que contém concentrações detetáveis dos tóxicos, mesmo quando administrados em doses terapêuticas, podendo inclusivamente apresentar concentrações de tóxicos cem vezes superiores às encontradas no sangue (Gisbert Calabuig, 1998). É ainda uma amostra homogénea, uma vez que os parâmetros fisiológicos variam dentro de limites muito estreitos, embora um bom processamento analítico seja necessário, uma vez que as interferências da matriz biológica poderão ser mínimas (Gisbert Calabuig, 1998; Teixeira, 2008). Por outro lado, a sua composição (98% de água) permite a realização de uma grande variedade de ensaios preliminares, como o rastreio de substâncias tóxicas, permitindo em paralelo a fácil aplicação de diversas técnicas extrativas. Constitui um meio adequado para a utilização de métodos de triagem rápida, por imunoensaios, para diversos grupos de compostos. A confirmação da presença de uma substância tóxica (ou de um seu metabolito) na urina permitirá, contemporaneamente, orientar a sua pesquisa no sangue, permitindo uma otimização dos processos extrativos das amostras de sangue (Gisbert Calabuig, 1998; Teixeira, 2008).

No entanto, algumas das desvantagens do uso da urina são o atraso na eliminação dos fármacos ou drogas e consequente aparecimento dessas substâncias na amostra biológica, a necessidade de supervisão durante a colheita, o risco de adulteração e a ausência de uma correlação com o estado de influenciado. Por outro lado, a urina requer a utilização de alguns procedimentos específicos do ponto de vista analítico, como por exemplo a necessidade de se proceder à sua hidrólise para a eventual deteção de conjugados glucuronizados por técnicas cromatográficas de confirmação (Abraham *et al.*, 2007).

A janela de detecção é um parâmetro importante, quer na avaliação clínica, quer na avaliação forense, no que ao consumo de drogas de abuso diz respeito. A janela de detecção dependerá da dose e via de administração, do metabolismo e da eliminação do composto-alvo, bem como da especificidade e limite de detecção da metodologia analítica. A via de administração condiciona a quantidade de droga que será absorvida e as diferenças interindividuais no metabolismo (lento ou rápido, pobre ou extenso), determinarão o tipo e quantidade de metabolitos que se formam, aumentando ou diminuindo também a janela de detecção (Teixeira, 2008).

A extensão do uso de GHB e dos seus precursores tem sido discutida, mas a inexistência de testes de rastreio associados a imunoensaios ou metodologias semelhantes torna difícil a aplicação de testes de rotina rápidos para a detecção deste composto (Maxwell, 2005). Conforme referido acima, o GHB é rapidamente metabolizado em CO_2 e H_2O , não apresentando metabolitos tóxicos na urina 4-12 horas após a ingestão. Este facto torna extremamente difícil a sua detecção em testes analíticos de rastreio de drogas ou numa hipotética entrada num Serviço de Urgência (Smith *et al.*, 2002; Gahlinger, 2004; Rodgers *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2004).

Desse modo, a utilização da urina justifica-se em situações de análise global de diversas amostras, tanto para confirmar uma eventual positividade exógena, como para verificar da possibilidade do examinando padecer da síndrome de acidúria do GHB (Fjeld *et al.*, 2012).

A variabilidade interindividual em amostras de urina foi também estudada. Moriya e colaboradores estudaram grupos de fumadores e não-fumadores, assim como grupos de consumidores e não-consumidores de bebidas alcoólicas, não tendo sido encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa nos valores de GHB observados nos diferentes grupos (Moriya *et al.*, 2006). A possível influência da dieta alimentar foi também estudada, com os resultados obtidos a sugerirem que o tipo de alimentação não influencia a concentração endógena de GHB na urina (Frucht *et al.*, 2005).

A tabela 3 apresenta um resumo de informação relativa aos métodos analíticos publicados referentes à detecção e quantificação de GHB em amostras de urina.

Tabela 3- Métodos de detecção e quantificação de GHB em urina.

Ref. ^a	Ano	Volume de amostra	Padrão Interno	Técnica Analítica	Extração	Derivatização	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Gama de Trabalho	Recuperação
Elian	2000	50 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	n.a.	0,2 – 5,0 mg/dL	80-85%
LeBeau <i>et al.</i>	2001	5 mL	GHB-d6	HS-GC-MS Quad SCAN mode	LLE	Conversão em GBL	0,06	0,19	0,2 – 10,0 µg/mL	n.d.
Kavanagh <i>et al.</i>	2001	1 mL	γ-caprolactona	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BMS:ACN:BS TFA	2	2	2 – 100 mg/L	n.d.
Elian	2002	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	n.a.	10 – 1000 µg/dL	n.d.
Kerrigan	2002	500 µL	GHB-d6	GC-MS PCI Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,2	0,4	n.a.	n.d.
Villain <i>et al.</i>	2003	200 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,2	1	1 – 200 mg/L	n.d.
Elliott <i>et al.</i>	2003	100 µL	Ácido Hexanóico	GC-FID	LLE	Conversão em GBL	2,5	n.a.	n.a.	n.d.
Elliott <i>et al.</i>	2003	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	0,2	1 – 10 mg/L	n.d.
Elliott <i>et al.</i>	2004	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.
Elliott <i>et al.</i>	2004	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	n.a.	1	n.a.	n.d.
Elliott <i>et al.</i>	2004	100 µL	GHB-d6	GC-FID	LLE	Conversão em GBL	n.a.	1	n.a.	n.d.
Crookes <i>et al.</i>	2004	2 mL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,1	0,2	0,2 – 5 mg/L	n.d.
Brenneise <i>n et al.</i>	2004	2 mL	γ-valerolactona	GC-MS Quad SIM mode	LLE	Não	0,1	0,1	0,1 – 200 mg/L	n.d.
Marinetti <i>et al.</i>	2005	200 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE + SPE	BSTFA:TMCS (99:1)	5	5	5 – 150 mg/L	n.d.
Shima <i>et al.</i>	2005	100 µL	Ácido Hidroxicapróico (HCA)	GC-MS Quad SCAN/SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,01	0,01	0,01 – 30 mg/L	85
Beránek <i>et al.</i>	2006	100 µL	Ácido Adípico	GC-MS Quad SIM mode	LLE	MSTFA	0,5	0,5	0 – 20 mg/L	n.d.
Moriya <i>et al.</i>	2006	1 mL	α-metileno-GBL	GC-FID	LLE	Conversão em GBL	0,06	0,18	0,18 – 87,5 mg/L	40%
Paul <i>et al.</i>	2006	50 µL	GHB-d6	GC-MS/MS IT MRM mode	LLE	BSTFA	0,01	2,5	2,5 – 100 mg/L	90%
Mari <i>et al.</i>	2009	50 µL	Nalorfina	GC-MS Quad SCAN/SIM mode	SPE	BSTFA:TMCS (99:1)	0,25	0,25	0,25 – 176 mg/L	n.d.
Andresen <i>et al.</i>	2010	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	ACN + [BSTFA:TMCS (99:1)] (2:1)	0,5	0,6	2 – 12 mg/L	30%
Kugelberg <i>et al.</i>	2010	n.a.	γ-valerolactona	GC-FID	LLE	Conversão em GBL	2	8	8 – 1000 mg/L	80%
Elliott e Hackett	2011	n.a.	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad MRM mode	SPE	Não	0,05	0,1	0,5 – 10 mg/L	79±2%
Johansen <i>et al.</i>	2011	20 µL	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad MRM mode	Diluição 10X	Não	n.a.	n.a.	1 – 100 mg/Kg	102%
Aromatari <i>o et al.</i>	2012	100 µL	GHB-d6	GC-MS Quad SIM mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	10	10	20 – 500 mg/L	n.d.
Dahl <i>et al.</i>	2012	100 µL	GHB-d6	LC-MS/MS Triple Quad (ESI +) MRM mode	Mini-UniPrep	Não	0,65	1,3	1,3 – 260,3 mg/L	>98%
Grennier <i>et al.</i>	2012	7 µL	-	Ensaio imunoenzimático	Centrifugação	Não	1,3	4,5	n.a.	104%

LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação; LLE – Extração Líquido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; n.d. – não divulgado.

O facto mais notório aponta para a quase unanimidade na utilização de procedimentos de extração líquido-líquido para o tratamento destas amostras. Na realidade, 81% dos métodos descritos (21 em 26) sugerem a utilização de LLE. Esta preferência será justificável pelo comportamento extrativo colaborante evidenciado por este tipo de amostras, com menor grau de interferentes da matriz.

Apesar das referidas limitações, a utilização de amostras alternativas contemporaneamente à utilização da urina poderá permitir uma interpretação dos resultados mais fidedigna e representativa da efetiva realidade do caso (Fjeld *et al.*, 2012). Assim, um estudo publicado sugere que a utilização do humor vítreo como amostra complementar pode colaborar na verificação da produção *postmortem*, já que os resultados obtidos são semelhantes aos obtidos em urina, fornecendo informação complementar ao patologista (Marinetti *et al.*, 2005). Em paralelo, outro grupo descreveu que, em dois casos com ausência de contacto com GHB, as concentrações encontradas na urina e no humor vítreo foram também comparáveis, situando-se ambas abaixo do *cut-off* sugerido como referencial do consumo exógeno de GHB (Elliott, 2004).

1.3. CABELO

A análise de cabelo para deteção de drogas de abuso foi iniciada há mais de 50 anos (Huestis *et al.*, 2007). A sua utilização tem sido cada vez mais generalizada, nomeadamente com o incremento da capacidade de extração dos compostos e com a melhorada capacidade de deteção, baseada na constante evolução dos equipamentos analíticos.

Uma das principais vantagens na utilização do cabelo advém da possibilidade de possuir uma maior janela de deteção dos compostos, associada, naturalmente, ao intervalo de tempo desde o último corte, quando comparada com outras amostras biológicas, nomeadamente o sangue e a urina. Paralelamente, uma grande variedade de compostos apresenta-se preservada no cabelo, permitindo a identificação dos mesmos algum tempo após a própria recolha da amostra (Huestis *et al.*, 2007).

As aplicações da análise de cariz forense em cabelo incluem a investigação criminal, nomeadamente na verificação do consumo agudo ou crónico de substâncias ilícitas, evidenciação da utilização de substâncias em casos de abuso sexual facilitado por substância, avaliação de capacidades parentais, monitorização de cumprimento de tratamento de desintoxicação por ordem judicial, entre outras (Huestis, 2008).

Na determinação do GHB, a utilização do cabelo como amostra biológica apresenta diversas vantagens específicas. Assim, as dificuldades inerentes à distinção de

um resultado positivo no sangue como sendo de origem exógena ou resultado de degradação *in vitro* ou *postmortem* podem ser minimizadas utilizando os resultados eventualmente obtidos com a análise de uma amostra de cabelo.

A análise segmental de cabelo é fundamental para a evidenciação de um consumo de GHB com origem externa. Esta evidenciação baseia-se na comparação das concentrações de GHB obtidas nos diferentes segmentos de cabelo, correspondentes a espaços temporais mais ou menos definidos, nomeadamente numa comparação direta entre os segmentos distais e os segmentos mais próximos da raiz (Goullé *et al.*, 2003; Kintz *et al.*, 2003). Sempre que se impõe esta hipótese, nomeadamente em indivíduos vivos, é importante que seja cumprido um intervalo de tempo de pelo menos três semanas, a fim de permitir a migração do GHB ao longo do fio de cabelo (Kintz *et al.*, 2003). Goullé *et al.* (2003), após a realização de um estudo de administração controlada de GHB a um indivíduo saudável, descreveram a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre valores basais e níveis compatíveis com o referido consumo, com o aumento da concentração de GHB no segmento de cabelo correspondente ao espaço temporal associado ao momento do consumo.

No contexto de abuso sexual facilitado por substância, a capacidade de deteção de um consumo agudo, associado a uma toma única do composto, seja ela voluntária ou involuntária, é fulcral. Na descrição de um caso real, a análise segmental de uma amostra de cabelo da vítima permitiu discernir uma diferença estatisticamente clara entre o valor basal e o valor representativo do momento do consumo (Kintz *et al.*, 2003). Embora o número total de estudos desenvolvidos em amostras de cabelo não seja vasto, é possível assumir-se, no entanto, que a análise segmental de cabelo permite uma distinção clara entre valores basais e valores associados a origem externa, sempre que haja um resultado positivo.

A tabela 4 apresenta um resumo de informação relativa aos métodos analíticos publicados referentes à deteção e quantificação de GHB em amostras de cabelo.

Tabela 4- Métodos de detecção e quantificação de GHB em cabelo.

Ref. ^a	Ano	Volume de amostra	Padrão Interno	Técnica Analítica	Extração	Derivatização	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Gama de Trabalho	Recuperação
Kalasinsky <i>et al.</i>	2001	10 mg	GHB-d ₆	GC-MS IT SCAN mode	LLE	BSTFA:TMCS (99:1)	1 ng/mg	1 ng/mg	0,01 – 100 ng/mg	80-85%
Kintz <i>et al.</i>	2003	5-10 mg	GHB-d ₆	GC-MS/MS Triple Quad SRM mode	LLE	[BSTFA:TMCS (99:1)] + acetato de etilo (1:1)	0,1 ng/mg	0,2 ng/mg	0,2 – 20 ng/mg	81,8%
Rossi <i>et al.</i>	2009	20 mg	GHB-d ₆	GC-MS Quad SCAN mode	LLE	[BSTFA:TMCS (99:1)] + acetato de etilo (1:1)	0,01 ng/mg	0,1 ng/mg	n.d.	n.d.
Stout <i>et al.</i>	2010	25 mg	GHB-d ₆	LC-MS/MS (APCI) triple quad MRM mode	LLE	Não	0,2 ng/mg	0,4 ng/mg	0,2 – 100 ng/mg	n.d.
Paul <i>et al.</i>	2011	20 mg	GHB-d ₆	GC-MS/MS Triple Quad MRM mode	SPE	BSTFA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bertol <i>et al.</i>	2012	25 mg	GHB-d ₆	LC-MS/MS (ESI) triple quad MRM mode	LLE	Não	0,5 ng/mg	0,6 ng/mg	0,6 – 50 ng/mg	> 89%
Bertol <i>et al.</i>	2012	25 mg	GHB-d ₆	GC-MS Quad SIM mode	LLE	[BSTFA:TMCS (99:1)] + acetato de etilo (1:1)	0,4 ng/mg	0,6 ng/mg	1 – 50 ng/mg	> 89%
Bertol <i>et al.</i>	2014	25 mg	GHB-d ₆	LC-MS/MS (ESI) triple quad MRM mode	LLE	Não	0,3 ng/mg	0,5 ng/mg	0,5 – 30 ng/mg	> 91%
Jagerdeo <i>et al.</i>	2015	25 mg	GHB-d ₆	LC-MS/MS (ESI) triple quad MRM mode	LLE and SPE	Não	0,4 ng/mg	1,2 ng/mg	0,4 – 50 ng/mg	n.d.

LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação; LLE – Extração Líquido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; n.d. – não divulgado.

Da análise da tabela 4 realça-se o baixo número de métodos publicados, o que poderá sugerir que esta é uma área do conhecimento ainda em desenvolvimento. Nota-se, em paralelo, a tendência para a publicação de metodologias associadas à utilização de MS em tandem, justificável pela sensibilidade otimizada e por uma capacidade de detecção melhorada, mesmo em concentrações mais baixas.

1.4. ESTABILIDADE DO GHB EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A partir do momento em que se percebeu que o GHB sofria um processo de transformação *postmortem* com consequências analíticas e forenses relevantes, foram sendo desenvolvidos diversos estudos no sentido de se perceber quais os fatores que influenciarão este processo, em que medida o fazem, e eventuais modos de o interromper ou, pelo menos, de o minimizar.

Tabela 5- Resultados obtidos em estudos de estabilidade, tempo de recolha de amostragem e armazenamento.

Ref	Casuística	[GHB] em mg/L	Temperatura de arquivo	Tempo até amostragem (dias)	Tempo de arquivo	Adição de preservante
Zörntle n <i>et al.</i> , 2012	15 amostras de plasma ante- mortem	Max: 2.5	4°C	3		X
Zörntle n <i>et al.</i> , 2012	50 amostras de sangue total ante-mortem	Max: 1.56	4°C	2		X
Zörntle n <i>et al.</i> , 2012	Amostras de soro ante- mortem	Max: 3 µg/mL	4°C / -20°C	2		NaF
Zörntle n <i>et al.</i> , 2012	Amostras de sangue total ante-mortem	Max: 13.1	---		36 meses	Tampão citrato
Shima <i>et al.</i> , 2005	20 amostras de sangue total ante-mortem	0.005-0.010	-20°C		3 horas	Recolha asséptica Sem preservante
Shima <i>et al.</i> , 2005	3 amostras de sangue total ante-mortem	Dia 0: 0.008 Dia 14: 0.017	-20°C	14		0.1 % EDTA
Shima <i>et al.</i> , 2005	3 amostras de sangue ante- mortem	Dia 0: 0.008 Dia 14: 0.016	4°C	14		0.1 % EDTA + NaN ₃ (0.1%)
Shima <i>et al.</i> , 2005	3 Amostras de sangue total Ante-mortem	Dia 0: 0.008 Dia 14: 0.020	4°C	14		0.1 % EDTA
Shima <i>et al.</i> , 2005	3 amostras de sangue total Ante-mortem	Dia 0: 0.008 Dia 14: 0.052	Temperatura ambiente	14		0.1 % EDTA
Shima <i>et al.</i> , 2005	3 Amostras de sangue total Ante-mortem	Max: 0.03	-20°C		70 semanas	
Shima <i>et al.</i> , 2005	3 amostras de sangue total Ante-mortem	Max: 0.4	4°C		70 semanas	Com e sem NaNO ₃
Kerrigan , 2002	100 amostras de urina ante- mortem	Max: 7	Temperatura ambiente		12 meses	NaF (1%)

LeBeau *et al.* (2001) observaram que a temperatura de armazenamento de amostras biológicas, nomeadamente urina, afeta a estabilidade da concentração do GHB, sendo o aumento verificado na concentração de GHB endógeno proporcional ao aumento da referida temperatura. Os mesmos autores sugerem que num estudo de armazenamento a longo prazo o aumento da concentração de GHB poderia ser explicado pelo diferencial de tempo já corrido, temperatura de armazenamento e alterações de pH, já que algum do GHB poderia passar a GBL numa urina considerada normal (LeBeau *et al.*, 2007; Andresen *et al.*, 2010).

Diversos autores estudaram também os valores máximos de GHB e a sua estabilidade em amostras de sangue total ou plasma *antemortem*, provenientes de indivíduos não consumidores. Estes estudos consideraram as condições de armazenamento, nomeadamente a sua temperatura, utilização de substâncias preservantes, tempo de amostragem, tempo de armazenamento da amostra e diferencial temporal entre a morte do indivíduo e a autópsia. A tabela 5 apresenta os valores relativos aos estudos mais relevantes realizados sobre o tema.

Diversos estudos indicam que o GHB se mantém estável em diferentes condições de armazenamento, em amostras de sangue provenientes de indivíduos vivos. Pelo contrário, em amostras de sangue *postmortem*, as concentrações observadas demonstram ser mais suscetíveis e influenciadas por essas mesmas condições, nomeadamente na temperatura de armazenamento e na utilização de substância preservante (Fjeld *et al.*, 2012).

Beránková *et al.* (2006) estudaram a estabilidade do GHB em amostras de urina e de sangue total *postmortem*, provenientes de indivíduos sem história de consumo de GHB. As amostras foram mantidas a 4°C, preservadas com NaF, tendo as análises sido efetuadas nos meses 2 e 4. Nos primeiros dois meses, as concentrações de GHB sofreram um aumento (até 30 mg/L), seguidas por uma diminuição nos dois meses seguintes. Considerando que já tinha sido previamente demonstrado que a produção *in vitro* de GHB durante o armazenamento é substancialmente superior em amostras de origem *postmortem*, torna-se assim crucial que seja feita uma utilização otimizada da gama de temperaturas de armazenamento, bem como uma escolha fundamentada da substância preservante a adicionar (como o NaF), sempre que se pretender arquivar uma amostra a longo prazo.

Fjeld *et al.* (2012) estudaram e reanalisaram 18 amostras de sangue total *postmortem*, armazenadas num intervalo de tempo entre 0,5 e 7,2 anos, tendo concluído

que 3 dos casos estudados sofreram um aumento, ao passo que os outros 15 evidenciaram um decréscimo na concentração de GHB. Embora tenha sido evidenciada uma redução estatisticamente significativa na concentração de GHB após armazenamento, não foi verificada qualquer correlação entre a concentração obtida e o tempo total de armazenamento da amostra. Estes autores sugerem, concluindo, que a concentração de GHB se mantém estável por um longo período de tempo, incluindo até vários anos, desde que as amostras de sangue total, tanto de origem *in vivo*, como de origem *postmortem*, sejam armazenadas a -20°C, com preservante baseado em fluoreto, nomeadamente o fluoreto de sódio.

Paul *et al.* (2006) estudaram a variação de GHB em seis amostras de urina branca, armazenadas a -20°C após 6, 12 e 24 meses, não tendo sido detetada qualquer variação estatisticamente significativa, comparando os valores obtidos nos diferentes tempos de armazenamento com os valores obtidos na análise efetuada 24 horas após a recolha das referidas amostras.

1.5. RECOLHA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

A recolha de amostras para determinação de GHB deverá idealmente cumprir alguns requisitos. Assim, estas deverão ser recolhidas assepticamente, o que naturalmente só é aplicável em amostras *in vivo*, já que usualmente o sangue vivo está livre de contaminação bacteriana. Deste modo, a recolha de amostras em condições de assépsia poderia eliminar, à partida, parte da produção e metabolização do GHB *in vivo*. Em contrapartida, as amostras *postmortem* iniciam, logo após a morte do indivíduo, os seus processos naturais de degradação e, paralelamente, a contaminação bacteriana é inevitável e imprevisível. Em suma, a putrefação é caracterizada pelo ressurgimento dos ácidos hidroxibutíricos, incluindo o GHB, sendo toda esta cadeia de processos de difícil caracterização, acompanhamento e reversão (Shima *et al.*, 2005). Numa abordagem alternativa e radical, é sugerida a possibilidade de se efetuar uma inativação total das enzimas do cérebro, efetuando, por exemplo, uma irradiação dos tecidos com micro-ondas, logo após a morte do indivíduo, prevenindo assim a produção *postmortem* de GHB (Elliott, 2004).

Concluindo, e independentemente do contexto, existe algum consenso relativamente às condições ideais de colheita e armazenamento das amostras biológicas para a deteção e quantificação de GHB. As amostras deverão ser recolhidas o mais

rapidamente possível após a suspeita de consumo, em contexto *in vivo*, ou após a morte, para amostras *postmortem*. Após a recolha, as amostras deverão ser armazenadas em condições de congelação, com a adição de uma substância preservante, nomeadamente a azida de sódio, o fluoreto de sódio ou o EDTA. O citrato de sódio, ou qualquer outro tampão citrato, deve ser evitado, já que conduz a concentrações aumentadas em amostras de sangue *postmortem*. Finalmente, as amostras deverão ser analisadas o mais rapidamente possível (Moriya e Hashimoto, 2004; Shima *et al.*, 2005, Andresen *et al.*, 2010).

2. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE GHB

A literatura sugere o isolamento de GHB através de procedimentos de SPE e extração líquido-líquido associados a derivatização por BSTFA, com deteção e quantificação por GC-MS. Na verdade, o passo de derivatização torna-se crucial devido à instabilidade térmica e natureza polar do composto. Uma alternativa à derivatização seria a conversão do GHB em GBL com posterior injeção em GC. Para ultrapassar este passo, foi já proposta a utilização do LC-MS, assim como foi já utilizada a eletroforese capilar como método de deteção e quantificação de GHB em amostras biológicas (McCusker *et al.*, 1999; Elia, 2000; Elia, 2001; Couper e Marinetti, 2002; Elia, 2002; Elliott *et al.*, 2004; Hennessy *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2004; Marinetti *et al.*, 2005; Shima *et al.*, 2005; Dimitrijevic *et al.*, 2005; Sassenbroeck *et al.*, 2007).

Para a GBL, a literatura consultada sugere a utilização do GC-MS com ionização química negativa, no sentido de melhorar a sensibilidade do método proposto. A GBL apresenta, em contrapartida, uma estabilidade comprovada em plasma de pelo menos 3 meses (Fukuy *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a proliferação e generalização das tecnologias cromatográficas com espectrometria de massa em *tandem* permitiu a consequente aplicação destas à determinação de GHB, nomeadamente à análise de amostras alternativas, como o cabelo (Kintz *et al.*, 2003; Stout *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011). Desse modo, obtêm-se limites de deteção inferiores, com uma resposta de quantificação aceitável, utilizando quantidades de amostra menores.

2.1. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E/OU EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Um método de extração aceitável deverá permitir um isolamento e uma concentração eficientes das substâncias a determinar, permitindo, paralelamente, a eliminação de interferentes originários da matriz da amostra em estudo. A extração é, na atualidade, um dos passos fulcrais no sucesso de um procedimento analítico, para uma identificação positiva da(s) substância(s) em estudo em amostras biológicas, já que sem um processo de extração eficiente todo o procedimento perde a sua aplicabilidade (Franke e De Zeeuw, 1998; Soriano *et al.*, 2001; Stimpfl e Vycudilik, 2004; Castro, 2008).

Na literatura publicada e consultada, a extração líquido-líquido corresponde ao procedimento de extração mais comum para a determinação de GHB, independentemente da amostra a analisar. Esta pode ser genericamente caracterizada por um passo de digestão, normalmente alcalina, sempre que estamos a trabalhar tecidos ou cabelos, seguida da adição de um ácido (sulfúrico ou clorídrico são os mais comuns), para efeitos de neutralização e posterior acidificação da amostra. O composto é extraído utilizando um solvente orgânico, sendo o mais citado o acetato de etilo.

No que à extração em fase sólida diz respeito, a literatura publicada evidencia que o GHB apresenta comportamentos distintos, consoante são utilizadas diferentes resinas, de acordo com o pH do processo. Assim, é, genericamente, sugerido que o GHB deve ser eluído em condições acídicas (Richard *et al.*, 2005).

Os procedimentos de SPE descritos são baseados em princípios diferenciados: SPE *mixed-mode*, SPE de troca catiónica e SPE de troca aniónica. Em todos eles, no entanto, o GHB apresenta um comportamento extrativo melhorado em condições de troca aniónica (condições essas que podem ser obtidas tanto com cartuchos específicos como com cartuchos do tipo *mixed-mode*). Nas referidas condições, a pH neutro, a parte da molécula correspondente ao ácido carboxílico está carregada negativamente, sendo fortemente retida pela resina sorbente, a qual se encontra carregada positivamente. Com a diminuição do pH, a molécula é recolhida pelo eluente, devido à consequente neutralização da sua carga negativa (Elian *et al.*, 2011).

Resumidamente, a maior parte dos procedimentos extrativos desenrola-se em passos de LLE. Esta abordagem poderá ser justificada, maioritariamente, pelo custo associado a cada análise, necessidades e gastos de solventes, reagentes e cartuchos de SPE, já que, provavelmente, o uso de uma pequena quantidade de solvente nos procedimentos descritos de LLE pode ser economicamente mais vantajoso do que a utilização de cartuchos de SPE e volumes de solventes para os diferentes passos de extração associados a um cartucho. Note-se, também, que a capacidade de recuperação descrita para os procedimentos de SPE atinge valores superiores a 90%, que são perfeitamente aceitáveis qualquer que seja o objetivo em vista para os procedimentos descritos. No entanto, esta sugestão não é totalmente fundamentada, já que é também notória a ausência de informação concreta relativa à capacidade de recuperação do método na maior parte das metodologias publicadas. Mesmo assim, e considerando que, tipicamente, as concentrações de GHB no sangue e na urina estão situadas na ordem dos mg/L, a capacidade de recuperação pode não ser considerada uma limitação da metodologia, desde que suportada pelos limites de deteção e quantificação estudados. Assim, a escolha do tipo de método extrativo a ser testado e aplicado tem que representar uma garantia de resposta eficaz para posterior análise no equipamento instrumental hifenado disponível.

2.1.1. INTERFERÊNCIAS NOS RESULTADOS QUANTITATIVOS DE GHB

O contexto endógeno do GHB pode trazer algumas dificuldades na quantificação de amostras com concentrações baixas, nomeadamente na análise de amostras alternativas, como o cabelo. Para evitar essa dificuldade de interpretação, alguns autores sugerem a utilização do método de adição de padrão para efeitos de calibração, nomeadamente em amostras de cabelo, onde os valores muito baixos podem não ser facilmente quantificáveis (Bertol *et al.*, 2012).

A interferência de alguns produtos comuns ao metabolismo do GHB nos resultados analíticos obtidos foi também estudada e publicada na literatura consultada. Os compostos α -hidroxibutirato, β -hidroxibutirato, γ -butirolactona, pregabalina, γ -valerolactona e 1,4-butanediol foram usados tanto para efeitos de deteção do seu consumo como para detetar eventuais interferentes nos procedimentos de extração e de análise instrumental (Stout *et al.*, 2010; Johansen e Windberg, 2011). Apenas foi notada uma interferência associada ao α -hidroxibutirato numa das transições em LC-MS-MS.

No entanto, mesmo quando o composto foi injetado em elevada concentração, a interferência observada foi considerada pelos autores como não sendo relevante (Johansen e Windberg, 2011).

2.2. MÉTODOS DE RASTREIO

2.2.1. RASTREIO DE GHB POR IMUNOENSAIOS

A existência de métodos de rastreio de GHB por imunoenaios é ainda pouco divulgada. Sabe-se, no entanto, que algumas companhias produtoras de testes estão a desenvolver técnicas específicas para este composto e, inclusivamente, a lançá-las no mercado. É, no entanto, assumidamente aceite que a utilização deste tipo de metodologia, genericamente associada a conceitos como a rapidez, elevado grau de automatismo e simplicidade, permite a análise com objetivos de rastreio, não só ao GHB como a diversos outros compostos, com bons resultados ao nível do elevado número de amostras analisado por unidade de tempo e ao custo por análise (Grenier *et al.*, 2012). A rapidez de resultados afigura-se igualmente crucial para uma interpretação forense e clínica mais eficaz dos resultados analíticos, nomeadamente na distinção entre valores endógenos e consumo exógeno de GHB, em casos de suspeita de abuso sexual facilitado por substância ou em contexto de intervenção médica de emergência.

2.2.2. RASTREIO DE GHB POR GC-FID

Tendo sido das primeiras técnicas utilizadas para a determinação de GHB em amostras biológicas, a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) passou a ser usada como teste de rastreio, implicando sempre a transformação de GHB em GBL, sendo os resultados positivos normalmente confirmados por técnicas hifenadas (Elliott *et al.*, 2004; Mari *et al.*, 2009).

Conforme mencionado, a conversão de GHB em GBL pode levantar algumas questões e dificuldades. A principal dificuldade advém da necessidade de garantir que a conversão do composto é total, pois só assim é possível garantir que uma quantificação posterior, utilizando este tipo de método e de detetor, é representativa da quantidade real do composto presente na amostra. No entanto, na literatura publicada e consultada esta possibilidade de conversão tem sido substituída genericamente por procedimentos de

derivatização, com passagem direta para as técnicas hifenadas, nomeadamente GC-MS(MS) (Elliott *et al.*, 2003, Elliott *et al.*, 2004).

2.3. DERIVATIZAÇÃO

A derivatização química pode ser utilizada com dois objetivos fulcrais: permitir a separação analítica de compostos que, de outra forma, não seriam detetáveis devido, por exemplo, a uma baixa volatilidade ou estabilidade e/ou otimizar a resposta analítica de um composto pela obtenção de comportamento cromatográfico ou detetabilidade melhorados (Knapp, 1979; Castro, 2008).

A derivatização analítica encontra aplicações nos vários ramos da química moderna. Esta técnica permitiu a análise, por cromatografia gasosa e mesmo por cromatografia líquida, de um grande número de compostos que, de outra forma, não poderiam ser analisados por estes métodos (Knapp, 1979; Castro, 2008).

Uma derivatização bem sucedida deverá obedecer aos seguintes requisitos (Segura *et al.*, 1998; Castro, 2008):

- A reação de derivatização deverá ser simples, rápida e com elevado rendimento;
- Originar um só composto derivatizado por cada analito;
- O composto derivatizado deverá ser estável nas condições de análise;
- A curva de calibração deverá apresentar um comportamento linear, para efeitos de quantificação, permitindo uma boa adequação à mesma dos pontos obtidos.

A “volatilização” de compostos pouco voláteis é a razão mais comum para a utilização de técnicas de derivatização química em análise por GC. A baixa volatilidade de muitos compostos resulta da presença na sua estrutura de grupos funcionais de elevada polaridade (COOH, N–H, O–H, S–H, etc). A funcionalização adequada destes grupos permite diminuir a sua polaridade, aumentando, consequentemente, a volatilidade do composto (Knapp, 1979; Castro, 2008).

A situação oposta também é possível: para compostos de muito baixo peso molecular, a sua excessiva volatilidade pode tornar-se um problema. Assim, a derivatização química permitirá aumentar a sua massa molecular, diminuindo a sua

volatilidade e permitindo uma separação cromatográfica mais eficiente (Knapp, 1979; Segura *et al.*, 1998; Castro, 2008).

A instabilidade térmica de alguns compostos é outra razão para proceder à sua derivatização, de modo a permitir a sua determinação analítica por cromatografia gasosa (Knapp, 1979; Segura *et al.*, 1998; Castro, 2008).

Outras situações que podem exigir a derivatização química envolvem, por exemplo, a obtenção de picos não simétricos, devidos a efeitos de adsorção da coluna. A tendência de amostras polares adsorverem aos locais ativos, tanto da coluna como da mistura de suporte da mesma, conduz também à utilização de procedimentos de derivatização química, no sentido de minimizar estes efeitos. Compostos químicos com comportamentos cromatográficos semelhantes podem também ser separados através de técnicas de derivatização adequadas (Knapp, 1979; Segura *et al.*, 1998; Castro, 2008).

A derivatização química pode ter também um papel essencial na análise por GC-MS. A derivatização poderá permitir obter compostos com padrões de fragmentação característicos em contraponto com fragmentações pouco específicas dos compostos não derivatizados, favorecendo a identificação inequívoca e, eventualmente, a seletividade e sensibilidade na quantificação do composto, nomeadamente com recurso à deteção em modo seletivo de iões (SIM – *Selected Ion Monitoring*) ou, quando disponível, à utilização de espetrometria de massa em *tandem* (Knapp, 1979; Segura *et al.*, 1998; Castro, 2008).

A aplicação de um passo de derivatização na determinação de GHB justifica-se para a análise da amostra por GC. Desse modo, o passo de derivatização permite melhorar a volatilidade do composto, aumentar o peso molecular do mesmo, diminuir a sua polaridade e melhorar a seletividade e eficiência de separação do método. O reagente de derivatização mais comum é o conjunto BSTFA:TMCS (99:1), com ou sem a concomitante presença de acetato de etilo ou acetonitrilo.

2.4. MÉTODOS DE CONFIRMAÇÃO

A definição do método de pesquisa, rastreio, confirmação e quantificação de um determinado composto, ou grupo de compostos, em amostras biológicas está sempre dependente de alguns fatores primordiais ao contexto de trabalho. Assim, a disponibilidade de equipamento instrumental de análise e do material necessário para a preparação prévia/extração das amostras-alvo é o primeiro fator a ser obrigatoriamente

considerado. Paralelamente, torna-se importante definir os objetivos de aplicação do procedimento, nomeadamente o tipo de amostra ou amostras biológicas a analisar e a gama de trabalho de interesse (Peters *et al.*, 2007).

Estes pressupostos também se aplicam à determinação do GHB. Neste contexto, a disponibilidade e escolha de tecnologias hifenadas em *tandem* (GC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS) permitem a obtenção de cromatogramas mais limpos, com menor intensidade das eventuais interferências da matriz. Consequentemente, a utilização de um procedimento de extração menos específico com a concomitante obtenção de um extrato não tão limpo, é compensada e ultrapassada pela utilização de tecnologia de MS em *tandem*, permitindo assim a obtenção de resultados quantitativamente fidedignos, mesmo a concentrações muito inferiores aos limites mínimos considerados relevantes.

2.4.1. GC-MS

O GC-MS com detector do tipo quadrupolo simples é, ainda hoje, o método instrumental mais comum para a determinação de GHB, principalmente em amostras de urina e sangue total. As tabelas atrás descritas (Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4) apresentam diversos procedimentos publicados para aplicação desta técnica hifenada, considerando a possibilidade de utilizar a espetrometria de massa em modo SIM e SCAN. Esta técnica analítica permitiu a obtenção de resultados aceitáveis em termos de identificação do composto, com o espectro de massa do composto sililado (GHB-di-TMS) tipicamente caracterizado pelos iões 233, 234 e 147 m/z para o GHB e 239, 240 e 147 m/z para o GHB-D₆. A presença do ião 147, comum aos dois compostos, pode ser uma limitação em termos de identificação positiva, dependendo dos critérios de aceitação de um resultado positivo. Nesse âmbito, e perante esta limitação, impõe-se que a separação cromatográfica e a resolução dos picos cromatográficos correspondentes aos sinais analíticos dos dois compostos sejam inequívocas. Em alternativa, pode ser considerada a possibilidade de utilização de um padrão interno alternativo. As sugestões apresentadas pela literatura consultada incluem o ácido hidroxicapróico, a γ -caprolactona, a γ -valerolactona, o ácido adípico e a nalorfina. De notar que a utilização destes compostos alternativos está usualmente inserida em métodos analíticos com diversos compostos-alvo.

2.4.2. (U)HPLC-MS(MS)

A utilização de procedimentos em equipamentos instrumentais do tipo (UH)PLC-MS-MS considera, tipicamente, a utilização de colunas tipo HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), usando o comportamento associado ao elevado caráter polar e ao pequeno tamanho da molécula de GHB para separar, identificar e quantificar o composto nas amostras-alvo. Em alguns casos, e sempre que a detecção de GHB está incluída num método com diversos compostos-alvo, as mais tradicionais colunas de fase reversa são também utilizadas. Em traços gerais, os sistemas MS-MS são utilizados no modo de ionização negativa, sendo as transições usadas as seguintes: $103 \rightarrow 57$ e $103 \rightarrow 85$. Em contrapartida, na utilização de métodos multi-compostos, a ionização positiva também se encontra descrita (Dahl *et al.*, 2012).

Uma questão a ser considerada tem a ver com a conversão na fonte de ionização de GHB em GBL, descrita por Johansen e Windberg (2011), seguindo a sua metodologia de detecção de GHB por LC-MS/MS. Esta conversão conduziu a uma detecção dupla de GHB e GBL no mesmo tempo de retenção, em condições MRM (*Multi Reaction Monitoring*), tempo de retenção que é diferente da GBL nativa. Assim, a utilização da cromatografia líquida com espectrometria de massa, em *tandem* ou do tipo quadrupolo simples, deve ter em consideração este fenómeno, para que o valor encontrado e calculado para a amostra seja realmente representativo da realidade da mesma (Johansen e Windberg, 2011).

2.4.3. GC-MS/MS

A cromatografia gasosa com espectrometria de massa em *tandem* (*tandem* MS ou MS/MS) representa uma evolução na capacidade de detecção e caracterização química de compostos através da espectrometria de massa. A estrutura associada à *tandem* MS pode variar, mas o objetivo é sempre o mesmo: num primeiro momento é feito o isolamento de um único fragmento, denominado ião-precursor, através da passagem por um primeiro quadrupólo; no final desse quadrupólo, o fragmento atravessa uma célula de colisão e, através de uma segunda descarga elétrica associada à presença de um gás de colisão (tipicamente Argon ou CH₄), sofre nova quebra. Os fragmentos originados por essa segunda quebra, denominados iões-produto, atravessam um segundo campo eletromagnético, que poderá ser um segundo quadrupolo ou um separador de massas do

tipo *time of flight*, permitindo uma separação e identificação inequívocas dos referidos iões-produto, quer em modo SIM, quer em modo SCAN.

No que diz respeito ao GHB, e relativamente à utilização de GC-MS/MS, esta encontra-se maioritariamente associada a utilização do ião 147 m/z, como ião-produto de eleição. No entanto, a origem deste é comum aos iões-precusores 233 e 239 m/z, referentes, respetivamente, ao GHB e GHB-D₆ (Kintz *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2011). Mais uma vez se afigura fundamental a obtenção de uma separação cromatográfica completa para uma identificação inequívoca do composto-alvo e do seu padrão interno. A alternativa pode surgir na utilização de um padrão interno alternativo, conforme descrito por alguns autores ou conforme foi efetuado no desenvolvimento da metodologia analítica descrita neste trabalho, a escolha de iões-produto alternativos, quer para identificação do composto (duas transições) quer para a identificação do padrão interno (uma transição).

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha final do método de deteção e quantificação de GHB baseia-se, assim, em diferentes pressupostos. O equipamento instrumental de análise disponível, a(s) amostra(s)-alvo e a aplicabilidade e objetivos do procedimento escolhido deverão ser tidos em conta numa escolha fundamentada e ponderada. A determinação do composto em contextos de consumo agudo ou crónico, nomeadamente em contexto recreativo ou no âmbito de objetivos culturistas, deve ser efetuada considerando as limitações associadas ao tempo de meia-vida do composto em fluídos biológicos, nomeadamente sangue e urina. A confirmação de utilização de GHB para efeitos de atividade criminal, nomeadamente associada a uma utilização única, como em contextos de abuso sexual facilitado por substância ou crime facilitado por substância, deverá considerar-se a possibilidade de utilização de amostras alternativas como o cabelo, o qual permitirá aumentar a janela de deteção e evitar, através da análise segmental de cabelo, algumas dificuldades associadas à distinção entre valores endógenos e exógenos de GHB.

A quantificação de valores endógenos de GHB para determinação de valores de *cut-off* de referência, bem como a quantificação nas referidas amostras alternativas, deverão ser preferencialmente efetuadas utilizando técnicas hifenadas em *tandem* (GC-MS/MS, LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS), já que estas tecnologias permitem uma resposta otimizada em termos de limite de detecção e de quantificação, sem comprometer a resposta global do método em termos de precisão, veracidade e repetibilidade.

1. FUNDAMENTOS GERAIS PARA A DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS

O grande impacto que a perícia médico-legal tem nos dias de hoje, incluindo na área da toxicologia forense, justifica a procura de métodos analíticos específicos e sensíveis, bem como a diversificação das amostras biológicas usadas, para a determinação das substâncias ilícitas com a precisão e fiabilidade exigidas, tendo em conta a relevância que os resultados podem ter a diferentes níveis, nomeadamente em contexto judicial. O GHB insere-se no grupo de substâncias ilícitas que despertaram a preocupação das autoridades devido ao seu consumo pernicioso e perigoso, bem como à dificuldade em distinguir, com a necessária fiabilidade, valores endógenos de níveis exógenos resultantes do consumo. Neste contexto, urge efetuar mais investigação com vista ao desenvolvimento de métodos que permita tal distinção com a especificidade, sensibilidade e precisão exigidas.

A metodologia analítica que se pretende desenvolver, bem como a sua aplicação a amostras reais, poderá ter uma aplicabilidade imediata, aumentando a capacidade de resposta do laboratório a este tipo de solicitações, com possível implicação médico-legal. Com efeito, a sua inclusão nos procedimentos de rotina do Serviço de Química e Toxicologia Forenses, tanto em casos reais de Clínica Forense como de Patologia Forense, constituirá uma inovação, não só ao nível do procedimento analítico até agora inexistente, como também ao nível dos tipos de amostras biológicas estudados.

A literatura consultada apresenta diversos estudos que tentam distinguir entre valores de concentrações endógenas e níveis representativos de consumo (exógenos) de GHB. No entanto, algumas disparidades de valores supostamente endógenos de GHB em sangue e urina, tanto em amostras de origem clínica como em amostras *postmortem* (nem sempre possíveis de ser distinguidos de valores encontrados em indivíduos consumidores) implicam algumas dificuldades na sua aplicação. Paralelamente, ainda não foi encontrado na literatura qualquer estudo relativo a valores endógenos de GHB no cabelo, numa comparação direta com valores encontrados na urina e/ou no sangue. A determinação em cabelo poderá dar uma importante indicação suplementar que permita essa distinção entre valor endógeno e valor associado a consumo de GHB. Paralelamente, espera-se poder aumentar a janela de deteção do seu consumo, tanto para efeitos recreativos como para efeitos de avaliação de abuso sexual.

Ao nível das amostras *postmortem*, a determinação em cabelo poderá vir a fornecer uma indicação suplementar que permita essa mesma distinção entre valor

endógeno, valor associado ao consumo de GHB e valor obtido em síntese *postmortem*. Será igualmente importante conseguir-se essa avaliação em indivíduos consumidores.

2. OBJETIVOS GERAIS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo deste trabalho de investigação original foi o de desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação de GHB em amostras de sangue total, urina e cabelo, por GC-MS/MS, que possa vir a ser usada em casos reais cuja determinação do composto seja relevante, nomeadamente para avaliação do estado de toxicodependência, na suspeita de abuso sexual facilitado pela utilização de substâncias tóxicas, na busca da causa de morte relacionada com o consumo de drogas, entre outros contextos de interesse.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como forma de atingir o objetivo principal do trabalho, foram definidos objetivos específicos, distribuídos pelos 3 capítulos do trabalho experimental:

1. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de GHB em sangue, urina e cabelo.** O objetivo deste capítulo incluiu o processo de desenvolvimento e otimização de um método analítico, com preparação prévia das respetivas amostras biológicas (precipitação com metanol, SPE, digestão ácida e LLE) e utilização de método instrumental de análise hifenado (GC-MS/MS). Pretendeu-se igualmente desenvolver um processo de validação analítica dos procedimentos desenvolvidos e otimizados.

2. **Aplicação da metodologia a casos reais, com a determinação de valores em amostras de sangue total, urina e cabelo *postmortem*.** Com esta parte do trabalho pretendeu-se definir uma gama de valores endógenos que permita concluir qual a importância da determinação de GHB em cabelo, verificando ainda a possibilidade de existência de produção *postmortem* de GHB.
3. **Determinação *antemortem* e *postmortem* de concentrações de GHB em pêlo e sangue de rato, mediante administração controlada.** O objetivo específico deste capítulo foi o de usar um modelo animal para obter valores de referência para casos positivos e negativos, bem como para estimar o intervalo de tempo ótimo de recolha de amostra e identificação do composto. Pretendeu-se ainda analisar o perfil farmacocinético do composto e a sua capacidade de distribuição/aparecimento em diferentes amostras biológicas.

Parte III – TRABALHO EXPERIMENTAL

Capítulo I – Caracterização do Método Analítico para Determinação de GHB em Amostras Biológicas

1. INTRODUÇÃO

A credibilidade dos dados analíticos é um pré-requisito fundamental para uma correta interpretação dos mesmos, tanto em contexto forense como em qualquer outro âmbito (académico, científico, rotina laboratorial, entre outros). O não cumprimento desta premissa conduzirá, inexoravelmente, a falsas interpretações e conclusões incorretas (Peters *et al.*, 2007).

Em termos genéricos, a validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar a aplicabilidade do mesmo ao fim a que se destina. Tal é possível através do cumprimento de diversos parâmetros, os quais variam com o tipo de método, tipo de objetivo, tipo de amostra e tipo de mensuranda (Peters *et al.*, 2007).

2. DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Conforme referido acima, a definição dos parâmetros de validação avaliados é variável, de acordo com os fins a que o método se destina. Para métodos quantitativos em contexto forense é geralmente aceite que os parâmetros de validação a ser avaliados deverão incluir o modelo de calibração (linearidade e eventuais fatores de ponderação), estabilidade, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão (bias) e limite inferior de quantificação (LLOQ). Outros parâmetros a considerar poderão ser o limite de deteção (LOD), recuperação do método, reprodutibilidade e robustez (Peters *et al.*, 2007).

O Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. tem aprovado e implementado um Procedimento Operacional de Validação Analítica de Procedimentos de Ensaio. Considerando que o desenvolvimento deste método tem, concomitantemente, como objetivo claro a sua disponibilização e aplicação à rotina laboratorial do referido Serviço, a validação analítica do mesmo seguiu as diretrizes emanadas no referido Procedimento Operacional, bem como em documentação conexa, integrada no Sistema

de Gestão da Qualidade implementado, segundo o referencial da Norma NP EN ISO/IEC 17025/2005.

3. METODOLOGIA DE VALIDAÇÃO APLICADA NO ESTUDO

3.1. ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

A seletividade pode ser definida como a capacidade que o método apresenta em distinguir inequivocamente o composto-alvo de todos os outros constituintes da amostra, incluindo metabolitos, produtos derivados da degradação, componentes da matriz ou outros (Peters *et al.*, 2007).

Esta seletividade é demonstrada através da ausência de sinais analíticos em amostras onde os compostos-alvo estejam ausentes. Em procedimentos quantitativos, aceita-se a existência de interferentes, desde que os parâmetros quantitativos do método (precisão, LLOQ e exatidão) não sofram alterações significativas (Peters *et al.*, 2007).

3.2. LIMITES DE DETEÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LOD) pode ser definido como o valor mínimo a partir do qual é possível detetar o analito com uma certeza estatística definida (normalmente 95%). Em paralelo, o limite inferior de quantificação (LLOQ) refere-se ao menor valor de concentração medido a partir do qual é possível uma quantificação do analito, com uma determinada precisão e exatidão (Peters *et al.*, 2007; Castro, 2008).

O LOD pode ser obtido através de diversas abordagens, desde o cálculo utilizando dados de uma curva de calibração situada numa gama próxima do valor previsto para o referido limite, até à utilização do sinal-ruído na avaliação da resposta analítica do composto no método em validação. Em alternativa, e considerando a definição prévia de uma gama de trabalho que seja representativa do universo de valores esperados nas amostras a estudar, pode ser considerada a definição de um valor de referência o qual, esse sim, deverá então ser estudado, a nível de comportamento analítico (Peters *et al.*, 2007).

O LLOQ pode igualmente ser definido utilizando dados da curva de calibração ou, em alternativa, ser definido referencialmente de acordo com, por exemplo, a gama de valores previamente descrita como sendo relevante para o objetivo do método. Neste caso, impõe-se o estudo analítico do seu comportamento (Peters *et al.*, 2007).

A resposta analítica do composto deve ser identificável, discreta e reprodutível, com uma precisão $\leq 10\%$ e uma exactidão compreendida entre 80 e 120% (Peters *et al.*, 2007).

3.3. LINEARIDADE/CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para que a quantificação efetuada seja credível, torna-se necessário avaliar o comportamento do método ao longo da gama de trabalho prevista, bem como a eventual possibilidade de utilização de fatores de ponderação associados à curva de calibração. Assim, após a definição da gama de trabalho, torna-se necessário escolher o modelo matemático mais representativo da relação entre a concentração do analito-alvo nas amostras e a respetiva resposta analítica (Peters *et al.*, 2007).

É referido na literatura que embora a utilização de modelos lineares seja a mais comum, nem sempre essa escolha é correta. De facto, a partir do momento em que a gama de trabalho apresenta mais do que uma ordem de grandeza, a utilização de fatores de ponderação deve ser considerada e estudada (Peters *et al.*, 2007).

Nesse sentido, e antes do estudo do tipo de ponderação a aplicar à curva de calibração, torna-se necessário avaliar a homocedasticidade de variâncias nos limites da gama. Essa homocedasticidade baseia-se na reinjeção sucessiva de duas amostras, com concentrações correspondentes ao limite inferior e superior da gama de trabalho e posterior aplicação de teste estatístico aos resultados obtidos (teste F), verificando a possível existência de diferenças significativas entre os valores de variância nos limites da gama de trabalho. Os valores de variância obtidos são utilizados para calcular um valor de F (F_{calc}), o qual será comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fischer a 95% (F_{crit}). Se $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$, então as diferenças de variâncias não são significativas e pode ser aplicado um modelo linear. Se $F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}}$, então as diferenças de variâncias são significativas e a aplicação de fatores de ponderação deverá ser estudada (Peters *et al.*, 2007; Castro, 2008).

3.4. PRECISÃO E EXATIDÃO

Em sentido estrito, a exatidão é influenciada pelo conjunto de erros sistemáticos (*bias*) e erros aleatórios (precisão) (Peters, *et al.*, 2007).

A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais do analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um mesmo volume homogêneo de uma matriz, ou seja, permite observar o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas de tomas múltiplas a partir de uma amostra homogênea nas condições prescritas (Peters e Maurer, 2002).

Pode subdividir-se em precisão intra-dia ou repetibilidade, que expressa a precisão durante o processamento de uma sequência analítica num curto período de tempo, e precisão inter-dia ou reprodutibilidade, que reflete a precisão no decorrer do tempo, podendo implicar diferentes analistas, equipamentos, reagentes e, inclusivamente, laboratórios (Peters e Maurer, 2002; Teixeira, 2008).

A precisão deve ser medida usando um mínimo de cinco determinações por cada concentração, aplicada, por sua vez, a um mínimo de dois níveis de concentração dentro do intervalo de concentrações da reta de calibração. A determinação deste parâmetro faz-se analisando a variação de conjuntos de replicados de padrões de concentração conhecida, sendo expressa em termos de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD= *Relative Standard Deviation*). É determinada através da percentagem do desvio padrão a dividir pelo cálculo da média das concentrações, a multiplicar por 100 (Gustafson *et al.*, 2003). A precisão calculada para cada nível de concentração não deve exceder 20% do coeficiente de variação (CV) (Peters e Maurer, 2002).

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade entre os resultados da concentração medida pelo método analítico relativamente ao valor real ou teórico (concentração) do analito, ou seja, exprime a concordância (% de desvio) entre o valor real determinado pelo método, ou seja, o resultado obtido, e o valor de referência, ou seja aquele que será o verdadeiro valor (Teixeira, 2008).

A exatidão de um método pode ser afetada pelos componentes do erro sistemático (*bias*) e do erro aleatório. No entanto, a exatidão é frequentemente usada apenas para descrever a componente do erro sistemático, isto é, como *bias*, sendo definida como a diferença entre a média dos resultados de uma série de ensaios e um

valor teórico aceite como exato, podendo ser expressa como um desvio entre essa média e o valor considerado verdadeiro, ou como percentagens de recuperação de um dado analito em estudos efetuados sobre amostras fortificadas (Teixeira, 2008).

Este parâmetro pode ser calculado através da equação $[(\text{média das concentrações medidas} - \text{valor teórico}) / \text{valor teórico}] \times 100$ (Gustafson *et al.*, 2003) e expresso em percentagem (%). Os valores médios desta equação, também denominada de erro (*inaccuracy, bias*), devem situar-se dentro de $\pm 20\%$ relativamente ao valor real, ou teórico (FDA, 2001).

De igual modo, a exatidão pode ser determinada com a seguinte fórmula:

Exatidão = $[1 - (\text{média das concentrações medidas} - \text{valor teórico}) / \text{valor teórico}] \times 100$ (Gustafson *et al.*, 2003).

3.5. RECUPERAÇÃO

A avaliação da capacidade de recuperação de um método não é considerada, por muitos autores, como essencial para a aceitação da aplicabilidade de um determinado método ao fim em vista, desde que outros parâmetros, nomeadamente os limites de deteção e de quantificação, a precisão e a exatidão, cumpram os requisitos necessários (Peters *et al.*, 2007).

O seu cálculo deve ser efetuado avaliando a diferença de áreas obtidas para o composto-alvo numa amostra que passou pelo procedimento de extração e preparação desenvolvido e outra amostra à qual o analito apenas foi acrescentado após esse mesmo procedimento de extração. É um valor expresso em percentagem, e alguns autores defendem um valor mínimo de 50% como aceitável (Peters *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SUBSTÂNCIAS ESTUDADAS

As substâncias estudadas foram o ácido γ -hidroxibutírico (GHB), o ácido γ -hidroxibutírico-D₆ (GHB-D₆) e o ácido hexa-hidroxicapróico (HCA). Foram adquiridos

padrões puros, nas seguintes condições: GHB e GHB-D₆ (Lipomed) em metanol, com concentração de 1 mg/mL; HCA em pó (Sigma-Aldrich), na quantidade de 100 mg.

Partindo destas soluções-mãe, foram preparadas soluções de trabalho de HCA a 30 mg/L e 3 mg/L, GHB a 10 mg/L e a 1 mg/L e GHB-D₆ também a 10 mg/L e a 1 mg/L, todas em metanol.

4.2. REAGENTES/GASES

O metanol, acetato de etilo e acetonitrilo utilizados nos procedimentos de extração e na preparação de soluções de trabalho foram do tipo *Gradient Grade* ou equivalente. O NaOH e o HCl foram preparados a partir de Soluções Titrisol 1 M/L (Merck, Darmstadt, Alemanha). O H₂SO₄ foi preparado a partir de H₂SO₄ > 98% (PANREAC, Barcelona, Espanha). O reagente de derivatização utilizado foi uma mistura BSTFA/TMCS (99:1) da Supelco (Madrid, Espanha). O gás de arrasto foi o Hélio BIP (GASIN) para GC e o gás de colisão foi o Árgon BIP (GASIN, Barcelona, Espanha).

4.3. MATERIAL UTILIZADO

A preparação das amostras utilizadas para a avaliação de todos os parâmetros de validação foi efetuada em tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL. A centrifugação pós-extração foi efetuada em centrífuga de bancada. A secagem do eluato foi feita em evaporador rotativo. A derivatização foi efetuada num banho seco a 65°C. Os cartuchos de extração em fase sólida testados foram os OASIS MCX[®] (WATERS, Barcelona, Espanha).

4.4. SISTEMA DE GC-MS/MS

O equipamento de GC-MS/MS utilizado (Anexo 1) foi um cromatógrafo *Bruker 450-GC* (Bruker Portugal, Lisboa) equipado com um injetor automático e uma coluna *J&W 5-MS (Agilent)* e acoplado a um Espectrómetro de Massa com um analisador de massas tipo triplo quadrupolo *Bruker 300-MS* (Bruker Portugal, Lisboa).

As condições cromatográficas usadas encontram-se descritas na Tabela 6.

A aquisição dos sinais cromatográficos foi efetuada utilizando o *software Workstation* da *Bruker* (Bruker Portugal, Lisboa).

Tabela 6 – Condições cromatográficas usadas.

Injector	Temperatura	250 °C
	Volume de Amostra	2 µL
	Modo de Injecção	Splitless
	Fluxo	1 mL/min
	Fluxo de Purga (<i>purge flow</i>)	20,0 mL/min
	Tempo de Purga (<i>purge time</i>)	1 min
	Gás Utilizado	Hélio BIP
Coluna	<i>J&W 5-MS</i>	0,25 mm / 30 m / 0,25 µm
Forno	Temperatura Inicial	70 °C
	Tempo Inicial	2 min
	Rampa de Temperatura	40° C/min
	Temperatura Final	290 °C
	Tempo Final	6 min
	Tempo Total de Corrida	14,50 min
Espectrómetro de Massa	Linha de Transferência	280 °C
	Temperatura do Quadrupolo	150 °C
	Temperatura da Fonte de Ionização	260 °C
	<i>Solvent Delay</i>	8 min
	Pressão do gás de colisão (Argon)	1,80 mTorr
	Voltagem da célula de colisão	10 eV
	Parâmetros de Aquisição	Modo SIM/SIM

O perfil espectral dos compostos estudados conduziu à escolha dos conjuntos ião-percursor/iões-produto descritos na tabela 7. O ião escolhido para a quantificação do composto-alvo encontra-se salientado em **negrito** (Cromatogramas em SCAN e SIM/SIM nos Anexos 2 a 6).

Tabela 7 – Grupos de iões definidos para aquisição em modo SIM/SIM.

Composto	Tempo de retenção	Ião-percursor (m/z)	Iões-produto (m/z)
GHB	9.41	233	143 ; 131
GHB-D ₆ (PI)	9.38	239	149
HCA (PI)	9.72	159	105

Capítulo II – Desenvolvimento do Método Analítico para a Detecção e Quantificação de GHB nas Amostras Biológicas

1. ENSAIOS EFETUADOS

1.1. ESTUDO EM SANGUE E URINA

1.1.1. SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

Considerando o carácter endógeno do GHB, torna-se impossível a obtenção de amostras biológicas brancas, para utilização nos diversos passos dos procedimentos de validação da metodologia analítica. Tal deve-se à presença prévia deste composto na amostra, o que, invariavelmente influenciaria sempre os resultados obtidos uma vez que nunca seria obtido um resultado negativo. Assim, e para se verificar o comportamento do método analítico, optou-se por substituir as amostras biológicas por água. Desse modo, verificou-se e evidenciou-se a aplicabilidade do procedimento extrativo e da corrida cromatográfica à determinação de GHB, ficando comprovada a ausência de qualquer influência por parte dos reagentes e solventes utilizados em todo o procedimento de determinação do composto.

1.1.2. ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO

A escolha de um padrão interno adequado é fulcral para a obtenção de resultados credíveis e representativos da realidade da amostra. Para tal, diversos critérios definem a caracterização de um bom padrão interno, nomeadamente ter um comportamento semelhante aos compostos-alvo, em termos de metodologia de preparação da amostra e posterior análise instrumental, ser distinguível dos compostos-alvo e não existir nas amostras em estudo, salvo quando adicionado pelo operador. O concomitante estudo do comportamento do padrão interno (PI) associado é igualmente fulcral, sendo sugerido quase mandatoriamente que o mesmo seja escolhido a partir dos homólogos deuterados disponíveis. Peters *et al.* (2007) sugerem que o padrão interno deuterado tenha um

mínimo de átomos de deutério igual ou superior a três, minimizando desse modo a influência do mesmo no sinal analítico do composto-alvo.

No método desenvolvido, foram testados dois padrões internos, o GHB-D₆ e o HCA (Ácido 6-hidroxicapróico). Embora a utilização do GHB-D₆ surgisse como possibilidade mais natural, o estudo de utilização do HCA baseou-se em dois pressupostos: a eventual impossibilidade de se poder utilizar o GHB-D₆ por incapacidade de distinção analítica entre este e o composto-alvo GHB e a existência de alternativa na eventualidade do comportamento analítico para efeitos de quantificação estar também influenciado pelo próprio padrão interno.

Os testes ao PI demonstraram que a capacidade de identificação do GHB ficava assegurada utilizando qualquer um dos dois compostos propostos. De facto, e analisando na tabela 7 os tempos de retenção de cada um dos três compostos envolvidos, verifica-se que nenhum destes é coincidente. Paralelamente, e para se verificar a ausência de influência do GHB-D₆ no resultado analítico de identificação do GHB, os padrões destes dois compostos foram injetados em separado e em solução de mistura, tendo sido possível detetar e isolar os mesmos, inequivocamente. Os iões-produto escolhidos também demonstraram ausência de influência mútua, permitindo a sua quantificação inequívoca.

Para testar o comportamento dos dois padrões internos, ao nível da quantificação, foram preparadas e processadas curvas de calibração, tendo sido verificado que as curvas elaboradas a partir dos dados analíticos do GHB e do HCA como padrão interno apresentavam piores critérios de aceitação das mesmas, nomeadamente o r^2 , do que as curvas que utilizaram o análogo deuterado do GHB. Tal situação era previsível, sendo o principal motivo pelo qual Peters *et al.* (2007) sugerem, sempre que possível, a utilização de um análogo deuterado do composto-alvo para utilização como padrão interno.

Assim, e considerando estes resultados, optou-se pela utilização do GHB-D₆ como padrão interno.

1.1.3. ESCOLHA DO PROCEDIMENTO EXTRATIVO ADEQUADO

A consulta da literatura publicada confirmou a existência de duas abordagens paralelas na extração de GHB em amostras biológicas, nomeadamente em sangue: extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). No desenvolvimento da

metodologia analítica para aplicação ao projeto aqui descrito, foram testadas cinco variações de um procedimento de SPE (Richard *et al.*, 2005) e duas LLE diferentes. Em termos gerais, verificou-se que o rendimento de extração dos procedimentos LLE apresentou um valor muito superior, quando comparado com os procedimentos de SPE. De facto, estes últimos apresentaram todos valores inferiores a 50%, muito embora os testes aos limites de detecção tenham demonstrado capacidade de identificação do GHB em concentrações de 200 ng/mL. Com estes dados, e considerando também a facilidade e rapidez de execução do procedimento, a nível laboratorial optou-se pela utilização e desenvolvimento de um procedimento extrativo do tipo LLE.

Note-se que os dois procedimentos testados foram adaptados a partir dos procedimentos publicados por Villain *et al.* (2003) e Shima *et al.* (2005).

Assim, os testes de extração envolveram a preparação de alíquotas de 50 e 100 µL de amostra branca às quais foi adicionado o composto e o respetivo padrão interno, a uma concentração de 2000 ng/mL.

As amostras foram fortificadas com três concentrações diferentes de GHB (200 ng/mL, 1000 ng/mL e 5000 ng/mL), abrangendo a gama de trabalho pretendida. Foram também testados dois volumes diferentes de reagente de extração [acetonitrilo e metanol, respetivamente, para os procedimentos de Villain *et al.* (2003) e Shima *et al.* (2005)].

O plano de testes e os resultados encontram-se resumidos na tabela 8 e na tabela 9.

Tabela 8 – Resultados obtidos nos testes de extração para o método adaptado de Villain *et al.* (2003)

Acetonitrilo (µL)	Amostra	GHB (ng/mL)	Volume Amostra (µL)	Razão GHB/GHB-D ₆
125	V1	Branco	50	-
125	V2	PI	50	-
250	V3	Branco	100	-
125	V4	200 MIX	50	0,018441
250	V5	200 MIX	100	0,012877
125	V6	1000 MIX	50	0,042847
250	V7	1000 MIX	100	0,058719
125	V8	5000 MIX	50	0,34541
250	V9	5000 MIX	100	0,318274
250	V10	PI	100	-

Tabela 9 – Resultados obtidos nos testes de extração para o método adaptado de Shima et al. (2005)

Metanol (μL)	Amostra	GHB (ng/mL)	Volume Amostra (μL)	Razão GHB/GHB-D ₆
125	S1	Branco	50	-
125	S2	PI	50	-
250	S3	Branco	100	-
125	S4	200 MIX	50	0,024249
250	S5	200 MIX	100	0,014245
125	S6	1000 MIX	50	0,04094
250	S7	1000 MIX	100	0,042033
125	S8	5000 MIX	50	0,235685
250	S9	5000 MIX	100	0,236717
250	S10	PI	100	-

A análise dos resultados permite concluir que não existem grandes diferenças nas razões das áreas dos sinais analíticos do GHB e do GHB-D₆, em qualquer dos dois métodos testados, e em qualquer dos volumes de amostra propostos. O comportamento do composto aparenta alguma linearidade, confirmada posteriormente. Perante estes resultados, optou-se, então, pela utilização do metanol como solvente de extração, por motivos eminentemente práticos, nomeadamente o seu baixo custo e a sua maior disponibilidade no laboratório do SQTf-N.

1.1.4. EXTRAÇÃO DE GHB POR METODOLOGIA LÍQUIDO-LÍQUIDO/PRECIPITAÇÃO METANÓLICA

Antes do início do procedimento extrativo em si, as amostras de sangue foram homogeneizadas, recorrendo-se a um misturador de rolos (*roller mixer*) para tubos durante pelo menos 15 minutos. Após este passo, iniciou-se o procedimento de extração líquido-líquido propriamente dito:

- Adicionaram-se a 100 μL de amostra de sangue um microtubo devidamente identificado, seguidos de 10 μL de solução de Padrão Interno a 1 mg/L e 300 μL de Metanol;
- Agitou-se no vortex durante cerca de 30 segundos;
- Centrifugou-se a 5000 RPM, durante 10 minutos;
- Retirou-se o sobrenadante para um tubo de rosca;
- Secou-se o sobrenadante recorrendo a um evaporador de amostras rotativo ou a um evaporador de N₂;

- f) Transferiu-se 60 µL de reagente de derivatização BSTFA/TMCS (99:1), posteriormente colocado em banho seco, a 65°C, durante 30 minutos;
- g) Procedeu-se à transferência para um microvial, ficando o extrato preparado para a análise instrumental.

1.1.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO – RESULTADOS OBTIDOS

A validação analítica foi constituída por duas fases. A primeira teve como cerne o desenvolvimento e otimização das condições instrumentais de análise, com o uso de soluções de trabalho, com os compostos diluídos em metanol, numa concentração de 10 mg/L para o GHB e para o GHB-D₆ e de 3 mg/L para o HCA.

A segunda fase teve como objetivo a verificação do cumprimento dos parâmetros de validação analítica necessários para a verificação da adequabilidade do método ao fim pretendido, tendo sido utilizadas alíquotas de água, fortificadas nas diferentes concentrações previstas na metodologia de validação, conforme contextualizado no Ponto 1.1 do Capítulo II.

Passa-se, de seguida, a descrever os ensaios realizados.

a) Desenvolvimento e otimização das condições instrumentais de análise

Através da utilização de soluções de trabalho preparadas a partir de padrões analíticos certificados, os compostos estudados foram derivatizados e injetados no equipamento instrumental, nas condições cromatográficas referidas na tabela 6, em modo SCAN, para identificação dos tempos de retenção e caracterização dos respetivos espectros de massa. Os espectros de massa obtidos em SCAN foram comparados com a base de dados disponível no equipamento, *NIST Mass Spectra Libraries* instalada no *software* do equipamento, para comparação e confirmação de identificação.

Após a identificação dos compostos com base nos correspondentes espectros de massa e definição dos respetivos tempos de retenção, adotou-se o modo de aquisição SIM (*Single Ion Monitoring*)/SCAN para a caracterização do perfil espectral dos iões de quebra obtidos para o ião precursor escolhido para cada composto. A gama de voltagens testada estendeu-se desde os 5 aos 50 eV. O perfil de quebra e os sinais analíticos obtidos levaram à escolha final de uma intensidade de 10 eV na célula de colisão.

Para o íão-percursor, foram escolhidos o íão 233 m/z para o GHB e o respectivo íão análogo do GHB-D₆ (239 m/z), escolha que teve como base dois fatores: no espectro de massa em SCAN o íão-base (mais intenso), quer para o GHB quer para o GHB-D₆, é o íão 147 m/z . Sendo comum aos dois compostos, e considerando que o tempo de retenção dos mesmos é muito próximo, conforme esperado, a posterior quebra deste mesmo precursor originaria íões-produto iguais. Desse modo, mesmo que a separação cromatográfica fosse parcialmente resolvida, existiria sempre o risco de não conseguir identificar inequivocamente nenhum dos dois compostos. Em paralelo, e considerando também que o íão-percursor sofrerá nova quebra, será conveniente escolher um fragmento com massa minimamente elevada, que permita a obtenção de produtos dessa mesma refragmentação que sejam ainda identificáveis e inequívocos dos compostos-alvo. Foi também esta segunda razão que justificou a escolha do íão-percursor do HCA.

b) Especificidade/seletividade

Foram preparadas cinco alíquotas negativas e cinco alíquotas positivas, a uma concentração de 100 ng/mL de GHB. Após a aplicação do procedimento analítico, verificou-se a inexistência tanto de falsos positivos como de falsos negativos, pelo que se considera o método seletivo e específico para o GHB.

c) Limites de detecção e de quantificação

As amostras utilizadas para os testes de especificidade e seletividade foram também usadas para o estudo do comportamento nos limites de detecção e quantificação, uma vez que a concentração escolhida para testar estes valores foi coincidente.

Para a validação do limite de detecção, obtiveram-se 0% de falsos negativos, o que indica que, a esta concentração, o composto é perfeitamente isolado e detetado.

Para a validação do limite de quantificação, as amostras utilizadas foram quantificadas utilizando uma curva de calibração realizada contemporaneamente ao processamento das mesmas, curva essa preparada com solução de trabalho distinta, evitando assim um eventual enviesamento de resultados.

Considerando estes pressupostos, o coeficiente de variação obtido para 5 amostras fortificadas a 100 ng/mL foi de 7,03%, inferior ao máximo aceitável, de 20%.

d) *Linearidade/curva de calibração*

O estudo da linearidade iniciou-se com a verificação da homocedasticidade de variâncias. Assim, foram efetuadas 5 re-injeções de uma amostra fortificada a 100 ng/mL e outra fortificada a 10000 ng/mL, níveis de concentração correspondentes aos limites da gama de trabalho prevista. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 10.

Tabela 10 – Valores obtidos nos testes de homocedasticidade de variâncias.

Nível (ng/mL)	100	100000
Injecção 1	101,18	132760,8
Injecção 2	111,24	115197,3
Injecção 3	106,29	118068,6
Injecção 4	119,84	133490,7
Injecção 5	125,08	127537,6
Média	112,726	125411,0
Desvio-Padrão	9,748984	839,7232
Variância	95,04268	705135,1

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados, através da aplicação de um Teste de F, conforme descrito no ponto 3.3 do Capítulo I da Parte III. Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 11.

Tabela 11 – Aplicação do teste de F.

Gama de Trabalho (ng/mL)	var2/var1 (F_{calc})	F_{crit} (95%)
100-100000	7419,142	4,026

Como o $F_{calc} > F_{crit}$, concluímos que as diferenças de variâncias são estatisticamente significativas. Assim sendo, passou-se à fase de estudo de aplicação de fatores de ponderação à curva de calibração. A partir dos sinais analíticos obtidos nos diversos níveis da curva de calibração utilizada para a verificação do comportamento nos limites da gama de trabalho, aplicaram-se diferentes fatores de ponderação, tendo sido calculados o fator de correlação (r^2) e os somatórios dos erros associados a cada curva de calibração resultante.

Os resultados obtidos estão representados na tabela 12.

Tabela 12 – Estudo dos fatores de ponderação.

Factor de ponderação	r^2	Σ de resíduos (%)	a	b	$S_{y/x}$
1 (não ponderada)	0,9914	196,153	-0,0122	0,000070	0,023604
1/x	0,9916	109,575	-0,0041	0,000071	0,024869
1/x ²	0,9824	91,902	-0,0010	0,000067	0,037504
1/x ^{1/2}	0,9927	146,666	-0,0080	0,000073	0,023821
1/y	0,9908	109,854	-0,0041	0,000071	0,025635
1/y ²	0,9794	97,440	-0,0008	0,000064	0,047794
1/y ^{1/2}	0,9926	146,565	-0,0080	0,000073	0,023877

A aplicação dos diversos fatores de ponderação permitiu a obtenção de diferentes resultados. A avaliação dos mesmos eliminou a utilização dos fatores $1/x^2$ e $1/y^2$ por ambos apresentarem r^2 inferior a 0,99, ponto essencial para a aceitação de uma curva de calibração. A avaliação dos resultados dos outros fatores de ponderação levou à escolha do fator $1/x$, já que é o que apresenta um menor somatório de resíduos, em termos percentuais.

e) Precisão e exatidão

A avaliação da precisão foi feita conjugando o cálculo da precisão intermédia, da repetibilidade e do limite de repetibilidade através da ferramenta ANOVA (Análise de Variâncias) do programa informático Excel®.

Para tal, foram escolhidos dois valores de concentração para cada composto, um representativo da gama baixa (500 ng/mL) e outro da gama alta (80000 ng/mL), e foram preparadas duas alíquotas por cada nível.

Este procedimento foi realizado cinco vezes, tendo sido contempladas diversas fontes de variabilidade. Foram utilizadas diferentes pipetas, soluções de trabalho, reagentes e solventes, tendo os testes sido efetuados em dias diferentes, entre outras fontes de variabilidade.

Os resultados obtidos permitiram também calcular o limite de repetibilidade. Este parâmetro não é mais do que o intervalo máximo que os valores de duas alíquotas referentes a uma mesma amostra podem apresentar para que a média dos mesmos possa ser aceite como representativa do valor real da amostra, devendo qualquer par de alíquotas passar por este crivo, de modo a que os seus resultados possam ser considerados conformes.

Para os cálculos matemáticos, foram utilizadas as fórmulas abaixo descritas:

Tabela 13 - Cálculo das estimativas da precisão.

Precisão	Expressão matemática
Repetibilidade (S_r)	$S_r = \sqrt{MSr}$
Precisão entre grupos (S_{run})	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MSr}{n}}$
Precisão intermédia (S_1)	$S_1 = \sqrt{S_r^2 + S_{run}^2}$
Limite de Repetibilidade (%)	CV x 2,8

Assim, para efeitos de estudo da precisão, os valores encontrados foram os seguintes:

Tabela 14 - Dados obtidos no estudo da precisão para o nível baixo de GHB (precisão intermédia, repetibilidade e limite de repetibilidade).

	[500 ng/mL]		Média	S	CV
Dia 1	576,67	516,34	546,51	42,66	7,81
Dia 2	520,7	537,16	528,93	11,64	2,20
Dia 3	713,43	620,95	667,19	65,39	9,80
Dia 4	329,49	343,79	336,64	10,11	3,00
Dia 5	396,94	342,86	369,90	38,24	10,34
			489,83	33,61	6,86
			Limite de repetibilidade (%)		19,21

Tabela 15 - Dados obtidos no estudo da precisão para o nível alto de GHB (precisão intermédia, repetibilidade e limite de repetibilidade).

	[80000 ng/mL]		Média	S	CV
Dia 1	64779,5	64809,5	64794,5	21,2	0,03
Dia 2	85664,6	90623,6	88144,1	3506,5	3,98
Dia 3	91364,7	97312,2	94338,5	4205,5	4,46
Dia 4	80188,7	77823,7	79006,2	1672,3	2,12
Dia 5	93278,0	86586,8	89932,4	4731,4	5,26
			83243,1	2827,4	3,40
			Limite de repetibilidade (%)		9,51

Para ambas as gamas foi verificado que o limite de repetibilidade é inferior a 20%, valor referencial para aplicação a um método analítico desta índole. Consequentemente, foi escolhido o valor encontrado mais elevado (19,2%) para aplicação a toda a gama de trabalho.

Para a precisão, foram também utilizados dados relativos a amostras fortificadas. Assim, através da fortificação de amostras brancas com duas concentrações diferentes, os valores foram obtidos utilizando as equações descritas a seguir:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{fortificada}}$$

onde:

\bar{C}_{obs} – Concentração média de uma série de análises de amostras fortificadas

$C_{fortificada}$ – Concentração da amostra fortificada

\bar{R}_m - Recuperação média

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_R^2}{n} \right)} \quad (9)$$

onde:

s_R – Desvio padrão de uma série de análises de amostras fortificadas

n – número de análises da amostra fortificada

As tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos e o tratamento desses mesmos dados.

Tabela 16 - Dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 500 ng/mL de GHB para o estudo da precisão

Séries	[500 ng/mL]		Média	DP
Dia 1	576,67	516,34	546,51	42,66
Dia 2	520,70	537,16	528,93	11,64
Dia 3	713,43	620,95	667,19	65,39
Dia 4	329,49	343,79	336,64	10,11
Dia 5	396,94	342,86	369,90	38,24
Valores médios			489,83	168,04

Tabela 17 – Transformação dos dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 500 ng/mL de GHB para o estudo da precisão

500 ng/mL	*100	*100	Média	Desvpadrão	Media %
Dia 1	1,15334	1,03268	1,09301	0,085320	
Dia 2	1,0414	1,07432	1,05786	0,023278	
Dia 3	1,42686	1,2419	1,33438	0,130786	
Dia 4	0,65898	0,68758	0,67328	0,020223	
Dia 5	0,79388	0,68572	0,7398	0,076481	
		Média	0,979666	0,263221	97,97

Tabela 18 - Dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 8000 ng/mL de GHB para o estudo da precisão

Séries	[8000 Ng/mL]		Média	DP
Dia 1	64779,5	64809,5	64794,5	21,2132
Dia 2	85664,6	90623,6	88144,1	3506,543
Dia 3	91364,7	97312,2	94338,45	4205,518
Dia 4	80188,7	77823,7	79006,2	1672,308
Dia 5	93278	86586,8	89932,4	4731,393
Valores médios			83243,13	2827,395

Tabela 19 – Transformação dos dados obtidos na análise de amostras fortificadas a 500 ng/mL de GHB para o estudo da precisão

80000 ng/mL	*100	*100	média	Desvpadrão	Media %
Dia 1	0,809744	0,81011875	0,809931	0,002652	
Dia 2	1,070808	1,132795	1,101801	0,438318	
Dia 3	1,142059	1,2164025	1,179231	0,525690	
Dia 4	1,002359	0,97279625	0,987578	0,209038	
Dia 5	1,165975	1,082335	1,124155	0,591424	
		Média	1,040539	0,141637028	104,05

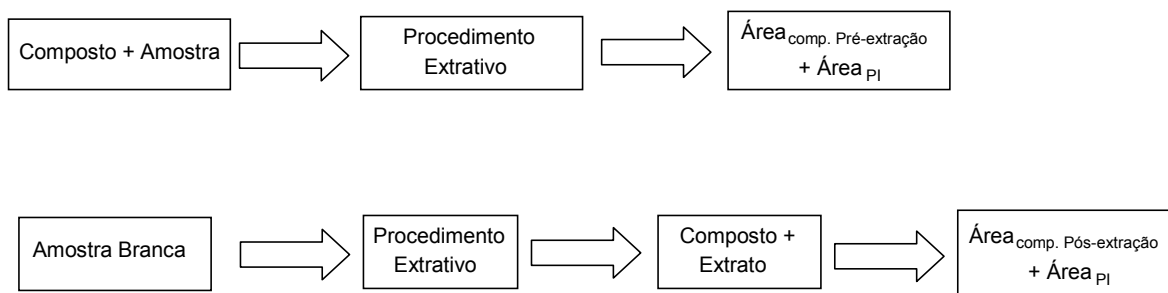
Os valores obtidos nos cálculos de recuperação média são perfeitamente compatíveis com valores de precisão aceitáveis, ficando ambos entre 80 e 120%.

f) Recuperação

A execução dos ensaios de recuperação implicou a adição do analito-alvo em duas concentrações diferentes (Tabela 20), com posterior passagem das amostras por todos os procedimentos previstos no método desenvolvido. Após a extração, o padrão interno foi adicionado e as amostras derivatizadas.

Paralelamente, foi preparada uma segunda série de amostras, às quais não foi adicionado qualquer composto antes do procedimento de extração. Após esta, foram adicionados os analito-alvo e padrão interno e executado o passo de derivatização química.

Os resultados cromatográficos obtidos foram comparados, permitindo calcular o rendimento de extração de todos os analitos estudados, comparação esta representada graficamente na figura 8.



$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área}_{\text{comp. Pré-extração}} / \text{Área}_{\text{PI}}}{\text{Área}_{\text{comp. Pós-extração}} / \text{Área}_{\text{PI}}} \times 100$$

Figura 8 – Procedimento utilizado nos ensaios de recuperação para amostras de sangue total e urina e respectiva fórmula de cálculo (comp. – composto; PI – padrão interno).

Os valores obtidos encontram-se representados na tabela 20 e coadunam-se com o sugerido pela literatura, ou seja, superiores a 50%. O valor obtido, representativo da capacidade de recuperação, a partir da média dos dois níveis estudados, foi de 86%.

Tabela 20 – Resultados obtidos nos ensaios de recuperação

Concentração de GHB	Recuperação Média por Nível (%)
500 ng/mL	74%
8000 ng/mL	98%

1.2. ESTUDO EM CABELO

1.2.1. SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

Conforme já referido, a grande vantagem que a análise do cabelo permite obter afigura-se no aumento substancial da janela de detecção, proporcional ao comprimento dos fios recolhidos, comparativamente com as amostras de urina e sangue total (Kintz, 2011).

As orientações da SoHT (*Society of Hair Testing*) indicam que a recolha da amostra deverá ser efetuada junto à zona do *vertex* posterior, na zona posterior da cabeça. Esta orientação deve-se ao facto desta zona apresentar uma menor variabilidade na taxa de crescimento do cabelo, do número de fios de cabelo em fase de crescimento ser mais constante e do cabelo ser menos sujeito a fatores como a idade e o género. As amostras de cabelo deverão ser cortadas o mais próximas possível do couro cabeludo e a sua recolha poderá ser feita em folha de alumínio, em envelope ou tubos de amostras, para posterior análise (Kintz - SoHT, 2004; SoHT, 2004).

1.2.2. EXTRAÇÃO DE GHB A PARTIR DO CABELO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O procedimento de extração é baseado no trabalho publicado por Kintz *et al* (2003). A descontaminação externa é efetuada com duas lavagens com 5 mL de diclorometano durante 2 minutos à temperatura ambiente. Entre 10 mg e 30 mg de cabelo descontaminado foram incubados em 1 mL de solução de NaOH 0,01 M, durante 16 horas a 56°C, com a adição prévia de GHB-D₆ como padrão interno. Após arrefecimento da amostra, o homogeneizado foi neutralizado com 0,5 mL de HCl 0,01 M. Após a verificação do pH da amostra (idealmente entre pH5 e pH6), o procedimento extrativo em si foi efetuado com 3 mL de acetato de etilo conjuntamente com 0,1 mL de H₂SO₄ 0,01 M, se necessário.

Após agitação (30 minutos) em agitador rotativo, a amostra foi centrifugada 15 minutos, a 5000 rpm. A fase orgânica foi seca num evaporador rotativo e o resíduo foi derivatizado com 50 µL de BSTFA/TMCS (99:1), durante 30 minutos, a 65°C. A amostra foi transferida para vial de reação e injetada no equipamento instrumental.

1.2.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO – RESULTADOS OBTIDOS

a) Especificidade/seletividade

Os testes de especificidade e seletividade foram efetuados considerando, uma vez mais, o contexto endógeno do GHB. Assim, foram testadas amostras apenas com diclorometano e GHB a 5 ng/mg, de modo a verificar eventuais influências dos solventes e reagentes nos resultados analíticos. Foram preparadas 5 alíquotas positivas e 5 alíquotas negativas e, em nenhuma delas, foi verificada a existência de falsos positivos ou falsos negativos. Assim, concluímos que este método se afigura específico e seletivo para o composto-alvo.

b) Limites de detecção e de quantificação

As amostras utilizadas para o estudo do comportamento nos limites de detecção e quantificação foram preparadas tendo em conta um valor de referência. O valor escolhido foi de 0,15 ng/mg, considerando o que se pretende em termos de observação de valores no cabelo.

Para a validação do limite de detecção, obtiveram-se 0% de falsos negativos, o que indica que, a esta concentração, o composto é perfeitamente isolado e detetado.

Para a validação do limite de quantificação, as amostras utilizadas foram quantificadas, utilizando-se uma curva de calibração realizada contemporaneamente ao processamento das mesmas, curva essa preparada com solução de trabalho distinta, evitando um eventual enviesamento de resultados.

Considerando estes pressupostos, o coeficiente de variação obtido para 5 amostras fortificadas a 0,15 ng/mL foi de 15,6%, inferior ao máximo aceitável, de 20%.

c) Linearidade/curva de calibração

As condições de linearidade e de aplicação de fatores de ponderação, previstas para as amostras de sangue e de urina, foram aplicadas também nas amostras de cabelo. Assim, foi utilizada uma reta de calibração de 0,5 ng/mg a 10 ng/mg, tendo

sido assumidos os mesmos parâmetros de linearidade e de calibração aplicados nas amostras de sangue e de urina.

d) Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão, foram escolhidas cinco amostras, das quais foram preparadas duas alíquotas por amostra. Este procedimento foi realizado contemplando diversas fontes de variabilidade. Foram utilizadas diferentes pipetas, soluções de trabalho, reagentes e solventes, os testes foram efetuados em dias diferentes, entre outras fontes de variabilidade.

Os resultados obtidos permitiram também calcular o limite de repetibilidade, o qual não é mais do que o intervalo máximo que os valores de duas alíquotas referentes a uma mesma amostra podem apresentar, para que a média dos mesmos possa ser aceite como representativa do valor real da amostra, devendo qualquer par de alíquotas passar por este crivo, de modo a que os seus resultados possam ser considerados conformes.

Para os cálculos matemáticos, foram utilizadas as fórmulas descritas abaixo:

Tabela 21 - Cálculo das estimativas da precisão.

Precisão	Expressão matemática
Repetibilidade (S_r)	$S_r = \sqrt{MSr}$
Precisão entre grupos (S_{run})	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MSr}{n}}$
Precisão intermédia (S_1)	$S_1 = \sqrt{S_r^2 + S_{run}^2}$
Limite de Repetibilidade (%)	CV x 2,8

Assim, para efeitos de estudo da precisão, os valores encontrados foram os seguintes:

Tabela 22 - Dados obtidos no estudo da Precisão para GHB (Precisão intermédia, Repetibilidade e Limite de Repetibilidade)

			Média	S	CV
Dia 1	1,28	1,13	1,21	0,11	8,80
Dia 2	5,27	4,88	5,08	0,28	5,43
Dia 3	4,89	5,11	5,00	0,16	3,11
Dia 4	7,83	7,82	7,83	0,01	0,09
Dia 5	8,59	8,81	8,70	0,16	1,79
					3,85
Limite de Repetibilidade (%)					10,77

Os resultados obtidos permitiram verificar que o limite de repetibilidade é inferior a 20%, valor referencial para aplicação a um método analítico desta índole. Consequentemente, este valor foi o considerado para efeitos de aplicação às amostras reais e à rotina laboratorial, para ser aplicado a toda a gama de trabalho.

Para a precisão, foram também utilizados dados relativos a amostras fortificadas.

Assim, através da fortificação de amostras brancas com concentrações diferentes, os valores foram obtidos utilizando as equações descritas a seguir:

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{fortificada}}$$

onde:

\bar{C}_{obs} – Concentração média de uma série de análises de amostras fortificadas

$C_{fortificada}$ – Concentração da amostra fortificada

\bar{R}_m - Recuperação média

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_R^2}{n}\right)} \quad (9)$$

onde:

s_R – Desvio padrão de uma série de análises de amostras fortificadas

n – número de análises da amostra fortificada

As tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos e o tratamento desses mesmos dados.

Tabela 23 - Dados obtidos na análise de amostras com GHB para o estudo da Precisão.

Séries	Média			DP
Dia 1	1,28	1,13	1,21	0,11
Dia 2	5,27	4,88	5,08	0,28
Dia 3	4,89	5,11	5,00	0,16
Dia 4	7,83	7,82	7,83	0,01
Dia 5	8,59	8,81	8,70	0,16
Valores médios				0,14

Tabela 24 – Transformação dos dados obtidos na análise de amostras com GHB para o estudo da precisão.

	*100	*100	Média	Desvpadrão	Media %
Dia 1	0,64	0,565	0,6025	0,053033	
Dia 2	1,054	0,976	1,015	0,055154	
Dia 3	0,978	1,022	1	0,031113	
Dia 4	0,97875	0,9775	0,978125	0,000884	
Dia 5	1,07375	1,10125	1,0875	0,019445	
		Média	0,936625	0,031926	93,66

Os valores obtidos nos cálculos de recuperação média são perfeitamente compatíveis com valores de precisão aceitáveis, nomeadamente ficando entre 80 e 120%.

2. COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES

A avaliação da aplicabilidade de um método analítico prende-se com a adequação do mesmo ao fim em causa, a capacidade técnica demonstrada com a sua aplicação e a fiabilidade dos resultados obtidos.

Os métodos analíticos desenvolvidos para aplicação às diferentes amostras biológicas passaram por um processo de validação analítica, com a avaliação de diversos parâmetros. Esta avaliação permitiu evidenciar a aplicabilidade dos métodos descritos às amostras-problema, com uma determinação analiticamente aceitável do composto-alvo.

No que diz respeito ao método aplicado às amostras de sangue total e urina, a utilização de GC-MS-MS é muito pouco citada na literatura consultada. De facto, esta é a primeira vez que é descrito um método para aplicação a amostras de sangue total utilizando a instrumentação GC-MS-MS com analisador do tipo triplo quadrupolo. A utilização deste tipo de analisador representa um fator importante na melhoria da seletividade e especificidade do método analítico. Esta melhoria é fundamentada pela capacidade de isolamento de um determinado fragmento, através do primeiro quadrupolo. Assim, o isolamento desse mesmo fragmento ou ião precursor representa o ponto de partida para um segundo momento de quebra iónica, na célula de colisão, com consequente processo analítico de identificação e isolamento de eventuais fragmentos

iónicos, ou íões produto, processo esse efetuado utilizando o segundo quadrupolo. Deste modo, o espectro fragmentar obtido é representativo, apenas, do isolamento e posterior comportamento de quebra do íão-percursor. Tal traduz-se numa melhoria notável relativamente à intensidade da linha de base analítica, aumento exponencial da razão sinal-ruído e detetabilidade e sensibilidade melhoradas, com capacidade de detecção a atingir concentrações muito mais baixas. As eventuais interferências de matriz, interferências químicas e eletrônicas provenientes do equipamento analítico ficam praticamente eliminadas.

O único método para sangue total e urina encontrado na literatura que aplica um procedimento do tipo GC-MS-MS foi o método descrito por Paul *et al.* (2006), embora utilize um detetor de massas do tipo *ion-trap*. A abordagem destes autores considerou a utilização dos íões percursores descritos neste trabalho (233 m/z para o GHB e 239 m/z para o GHB-D₆). No entanto, a opção de escolha do íão 147 como íão produto para ambos os compostos implica uma sujeição constante à possibilidade de surgimento de picos fantasma, na transição entre segmentos analíticos, culminando numa eventual interferência nos resultados obtidos, baseando-se a identificação, praticamente, na pequena diferença entre os tempos de retenção dos dois compostos e seleção dos respetivos canais de sinal analítico. Em contrapartida, a opção no método agora desenvolvido de utilização de dois íões produto diferenciados (143 para o GHB e 149 para o GHB-D₆) contorna esta dificuldade, resolvendo-a com a garantia de uma seletividade melhorada para cada composto, mesmo considerando que os dois fragmentos escolhidos apresentam um sinal analítico, em termos absolutos, inferior ao fragmento 147 m/z. Resumindo, a identificação passa a estar baseada no tempo de retenção absoluto do GHB, tempo de retenção relativo do GHB com o GHB-D₆, isolamento do íão percursor 233 m/z e verificação do comportamento analítico dos íões produto 143 m/z e 131 m/z.

Considerando o procedimento extrativo, foi seguida a tendência generalizada, através da utilização de um procedimento de extração do tipo líquido-líquido. A fundamentação desta escolha advém, conforme referido anteriormente, da utilização deste tipo de extração na grande maioria das metodologias descritas na literatura consultada, conforme as Tabelas 2 e 3 inseridas no Capítulo III da Parte I. Para além do natural contexto prévio, os resultados obtidos, nomeadamente em termos de capacidade de recuperação, são compatíveis com o objetivo em causa, evidenciando-se como eficazes para a obtenção de resultados aceitáveis, mesmo em concentrações baixas. Dos

métodos consultados, apenas onze apresentam informação relativa à capacidade de recuperação extrativa para amostras de sangue total e dez apresentam valores para amostras de urina. Desses, apenas Paul *et al.* (2006), Johansen *et al.* (2011) e Lott *et al.* (2012) apresentam valores ligeiramente superiores, nomeadamente 90%, 88% e 97% de capacidade de recuperação.

Analisando, em contrapartida, o limite de deteção e o limite inferior de quantificação, quer para sangue quer para urina, verificamos que o valor determinado, validado e testado se encontra entre os mais baixos, quando comparado com a literatura publicada. A determinação dos valores destes dois parâmetros é variável, tendo sido utilizados diferentes métodos para tal, o que também justifica quer a variabilidade, quer o valor absoluto dos dois parâmetros. Richard *et al.* (2005) e Zorntlein *et al.* (2012), cujos trabalhos apresentam os valores de LOD e LLOQ mais baixos do que os aqui defendidos, determinaram-nos analiticamente através do método clássico de utilização do sinal/ruído (3:1 para o LOD e 10:1 para o LLOQ). Os valores obtidos estão descritos nas tabelas 2 e 3 do Capítulo III da Parte I. No entanto, o valor inferior da gama de trabalho começa, em ambos os casos, nos 100 ng/mL, coadunando-se com a opção assumida para o método agora descrito, demonstrando também a aplicabilidade do método ao fim em vista.

Relativamente ao método aplicado a amostras de cabelo, a avaliação dos resultados obtidos terá também que ser efetuada considerando outras metodologias previamente descritas.

Avaliando a resposta em termos de seletividade, especificidade e capacidade de identificação, Kintz *et al.* (2003) e Paul *et al.* (2011) descrevem métodos de deteção de GHB em amostras de cabelo através de GC-MS-MS, com detetor do tipo triplo quadrupolo. No entanto, e conforme descrito acima para as amostras de sangue e urina, estes métodos consideram o mesmo ião-produto, proveniente dos iões precursores do composto-alvo e do padrão interno, nomeadamente o ião 147 m/z por quebra quer do ião 233 m/z do GHB quer do ião 239 do GHB-D₆. Complementarmente, a identificação positiva é baseada apenas nesse mesmo ião de quantificação. Em contrapartida, a identificação do GHB utilizando o método ora apresentado baseia-se na monitorização de dois iões produto (143 m/z, como ião de quantificação, e 131 m/z) e na utilização de dois iões precursores diferentes, característicos ora do GHB ora do GHB-D₆.

A avaliação do limite de deteção e do limite inferior de quantificação poderá ser feita considerando dois pressupostos: a adequabilidade dos mesmos aos fins em causa e,

paralelamente, a comparação com outras metodologias análogas. Note-se que nos métodos descritos na literatura, o LOD e o LLOQ são calculados através do estudo do nível da razão sinal/ruído. A opção do método aqui descrito prevê a escolha, definição e posterior verificação comportamental, a nível analítico, do composto a uma determinada concentração, representativa da realidade esperada em termos de amostras analisadas. A escolha desses mesmos valores coaduna-se com os valores previamente descritos, quer para métodos aplicados a GC-MS-MS (Kintz *et al.* em 2003) quer a métodos aplicados a LC-MS-MS (Bertol *et al.*, em 2012 e novamente em 2014). Paul *et al.* (2010), inclusivamente, não apresentam valores referenciais para o LOD e o LLOQ. No entanto, referem ter encontrado valores endógenos a partir de 0,1 ng/mg, pelo que podemos concluir que os seus limites poderão estar inseridos nesta gama. Deste modo, os limites definidos para o método ora descrito são comparáveis e aceitáveis, relativamente aos descritos em métodos semelhantes, demonstrando que a mais-valia associada à especificidade e seletividade melhoradas não provoca qualquer perda relevante ao nível da sensibilidade.

Assim, conclui-se que estes métodos cumprem o exigido analiticamente, para aplicação em contexto forense, podendo ser aplicados à rotina laboratorial e à análise forense de casos reais.

Capítulo III – Aplicação do Método Analítico Validado a Amostras de Casos Reais *Postmortem*

1. INTRODUÇÃO

Conforme referido anteriormente, a concentração de GHB *post-mortem* constitui um aspeto de difícil interpretação. Tal deve-se à variação nas concentrações que se podem atingir ao longo do normal percurso de degradação *postmortem*, bem como à conhecida dificuldade em definir uma distinção inequívoca entre uma gama de valores representativa de um contexto endógeno e os valores associados a uma origem exógena, correspondentes a episódios de consumo do composto, tanto voluntário como involuntário.

Esta dificuldade pode, no entanto, ser minimizada com a análise contemporânea de uma série de amostras alternativas. Esta avaliação “multi-amostra” poderá permitir uma interpretação dos resultados mais fidedigna, representando efetivamente a realidade do caso e permitindo uma caracterização mais completa do mesmo (Fjeld *et al.*, 2012).

A utilização de valores de referência como critério de aceitação do resultado obtido como sendo representativo de uma origem exógena foi sofrendo uma evolução, à medida que se foram descobrindo e caracterizando os mecanismos de comportamento do GHB num contexto *postmortem*. Assim, os valores sugeridos como *cut-off* para amostras de sangue situam-se entre os 10 mg/L e os 30 mg/L, tendo em consideração o estado da amostra, o intervalo *postmortem* e o intervalo de tempo entre a morte do indivíduo e a amostragem, nomeadamente a autópsia.

Neste capítulo são apresentados os resultados relativos à determinação analítica de GHB em amostras *postmortem* de sangue total e de cabelo recolhidas em cadáveres autopsiados na Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.. Será também discutida a possível relação entre os valores obtidos e a sua aplicação à determinação do intervalo *postmortem*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS/AMOSTRAS EM ANÁLISE

As amostras foram recolhidas em cadáveres autopsiados no Serviço de Patologia e Clínica Forenses da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.. A escolha dos indivíduos foi aleatória, sendo apenas considerada a informação relativa à suspeita da presença de GHB e a disponibilidade de informação relativa à data de morte. Em todos os casos analisados, não existia, à partida, qualquer informação indicativa da presença ou consumo prévio de GHB. A caracterização específica de cada caso será efetuada conjuntamente com os resultados obtidos nas determinações analíticas efetuadas, no ponto 3 deste capítulo.

2.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras foram recolhidas de acordo com os procedimentos aplicados na rotina do Serviço de Patologia e Clínica Forenses, seguindo as boas práticas e os protocolos instituídos.

As amostras de sangue foram recolhidas para tubos de 10 mL de polipropileno, com adição simultânea de fluoreto de sódio. Após etiquetagem, as amostras foram refrigeradas (-20°C) até ao seu processamento e análise instrumental, de acordo com o referido no Ponto 4 do Capítulo II da Parte I.

As amostras de cabelo foram recolhidas seguindo as orientações sugeridas pela SoHT (Kintz - SoHT, 2004; SoHT, 2004), nomeadamente, através da recolha da amostra junto à zona do *vertex* posterior, na zona posterior da cabeça, utilizando tesouras de tecidos biológicos, em aço inox. Após o corte, as amostras de cabelo foram recolhidas em envelopes de papel e armazenadas em local seco e fechado, até ao início do processamento analítico.

A Tabela 25 apresenta, resumidamente, o contexto de cada caso, nomeadamente ao nível da caracterização individual dos cadáveres, causa provável de morte e provável etiologia médico-legal.

Tabela 25 – Caracterização geral dos casos analisados.

Caso	Idade	Sexo	Causa provável de Morte	Diagnóstico Diferencial Médico-Legal	Outras Substâncias presentes	Intervalo <i>Post-mortem</i> (dias)
1	92	M	Lesão traumática	Acidente	Tramadol ; Sertralina < 25	4
2	55	M	Asfixia mecânica	Suicídio	etanol: 0.1 g/L	3
3	69	M	Morte natural	Natural		1
4	61	M	Morte natural	Natural		2
5	47	F	Lesão traumática	Suicídio	Sertralina: 528 ng/mL; Zolpidem < 100 ng/mL	2
6	63	M	Causa indeterminada	Indeterminada	etanol: 0.15 g/L; lidocaína; tiapride 1455 ng/mL; Diazepam 6.54 ng/mL; Oxazepam 27.9 ng/mL	3
7	53	M	Morte natural	Natural	etanol; 1.73 g/L	
8	53	F	Morte natural	Natural	diazepam 1.96 ng/mL; oxazepam 1.2 ng/mL	4
9	80	M	Lesão traumática	Suicídio		1
10	48	M	Lesão traumática	Suicídio	etanol: 0.29 g/L	3
11	79	M	Causa indeterminada	Suicídio	sertralina 118 ng/mL; trazodone 168 ng/mL	1
12	76	M	Morte natural	Natural		3
13	22	M	Lesão traumática	Acidente		0
14	-	M	Causa indeterminada	Acidente	etanol: 1.59 g/L	1
15	62	F	Morte natural	Natural	Zolpidem < 100	1
16	69	M	Lesão traumática	Suicídio		1
17	55	M	Intoxicação por CO	Acidente		1
18	48	M	Causa indeterminada	Indeterminada	etanol: 0.33 g/L; THC-COOH 17.2 ng/mL	2
19	57	M	Lesão traumática	Acidente	etanol: 0.92 g/L	2
20	74	F	Morte natural	Natural	Bromazepam: 17.9 ng/mL	1
21	45	F	Causa indeterminada	Indeterminada	etanol: 0,72 g/L; ciamemazina 246 ng/mL	0
22	23	M	Lesão traumática	Acidente		3
23	50	M	Causa indeterminada	Indeterminada	Tiapride 312 ng/mL; Diazepam 53.8 ng/mL; Nordiazepam 12.7 ng/mL; Temazepam 1.28 ng/mL	2
24	32	M	Lesão traumática	Suicídio	Clozapina 783 ng/mL; Lorazepam 1.33 ng/mL; Diazepam 392 ng/mL; Nordiazepam 392 ng/mL; Oxazepam 9.43 ng/mL; Temazepam 8.73 ng/mL	1
25	14	M	Lesão traumática	Acidente		1
26	59	M	Lesão traumática	Acidente		1
27	46	M	Morte natural	Natural	etanol: 1,09 g/L; Trazodona 530 ng/mL; EDDP 71.3 ng/mL; Metadona 522 ng/mL; Flurazepam 101 ng/mL; Desalquilflurazepam 79.1 ng/mL	2

Tabela 25 (continuação) – Caracterização geral dos casos analisados

Caso	Idade	Sexo	Causa provável de Morte	Diagnóstico Diferencial Médico-Legal	Outras Substâncias presentes	Intervalo <i>Post-mortem</i> (dias)
28	-	M	Causa indeterminada	Acidente	etanol: 4,06 g/L; Desalquilflurazepam 24,3 ng/mL	1
29	64	M	Morte natural	Natural		1
30	46	F	Morte natural	Natural		1
31	46	F	Morte natural	Natural	11-OH-THC 1.64 ng/mL; THC 3.46 ng/mL; THCCOOH 13.8 ng/mL	0
32	67	M	Lesão traumática	Acidente		1
33	21	F	Lesão traumática	Acidente		2
34	76	F	Morte natural	Natural		2

O painel de amostras inclui 34 casos, sendo 9 indivíduos do sexo feminino e 25 do sexo masculino.

Quanto à faixa etária, os indivíduos foram divididos em três faixas etárias: 1-44 anos (n=5), 45-60 anos (n=14) e superior a 61 anos (n=13). Em dois dos casos não foi possível identificar a idade dos indivíduos.

Quanto ao diagnóstico diferencial médico-legal, estão incluídos 11 casos com diagnóstico de acidente, 7 com diagnóstico de suicídio, 12 com causa de morte natural e 4 com causa de morte indeterminada. Para efeitos de avaliação estatística dos resultados, os casos de morte natural e de morte indeterminada foram agrupados.

Em termos de intervalo *postmortem* (PMI), os casos foram todos autopsiados entre 0 (zero) e 4 dias após a confirmação da morte do indivíduo, distribuídos da seguinte forma: 3 casos com PMI < 24 horas, 15 com PMI entre 24 e 48 horas, 8 com PMI entre 48 e 72 horas, 5 com PMI entre 72 e 96 horas e 2 casos com PMI entre 96 e 120 horas.

Relativamente à presença de outras substâncias, que estejam ou não diretamente envolvidas na causa de morte, 22 dos casos apresentaram a presença de uma ou mais substâncias, ao passo que 12 casos não apresentaram qualquer substância do painel analisado por rotina.

Espera-se, em suma, que a variabilidade de casos descrita permita inferir uma representatividade significativa da realidade.

2.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE GHB

As amostras de sangue foram preparadas de acordo com o Ponto 1.1.4 do Capítulo II da Parte III e processadas analiticamente segundo o Ponto 4.4 do Capítulo III da Parte I.

As amostras de cabelo foram preparadas de acordo com o Ponto 1.2.2 do Capítulo II da Parte III e processadas analiticamente segundo o Ponto 4.4 do Capítulo III da Parte I.

2.4. TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS

2.4.1. TESTE DE SHAPIRO-WILK

O primeiro passo para a análise estatística dos dados implica a verificação da normalidade da distribuição da amostra, podendo essa verificação ser feita através de diversos testes estatísticos. Torman *et al.* (2012), após comparação dos resultados obtidos com a aplicação de diversos testes estatísticos, sugeriram a utilização do teste de Shapiro-Wilk como uma das melhores alternativas. Esta análise foi efetuada considerando a totalidade dos valores obtidos.

O teste de Shapiro-Wilk pode ser efetuado através da utilização do *software* estatístico SPSS®, o qual apresenta um quadro-resumo com os resultados obtidos, nomeadamente a significância estatística de acordo com um determinado grau de confiança (neste caso, 95%).

2.4.2. ANÁLISE DE VARIÂNCIAS (ANOVA)

A análise de variâncias (ANOVA) é uma ferramenta poderosa que permite avaliar a relevância estatística associada à comparação de diferentes grupos de dados. Esta ferramenta permite, especificamente, a comparação de diferentes e hipotéticas fontes de variação e influência de resultados reais, assumindo, mesmo assim, que a distribuição dos dados é Gaussiana. A ANOVA aplica inicialmente um teste de F, para

verificação da eventual homocedasticidade de variâncias. O teste de F utiliza as variâncias obtidas para se obter o valor de F_{calc} através da fórmula s_2^2/s_1^2 . Este valor é comparado com o F_{crit} (valor encontrado na tabela da distribuição F de *Snedecor/Fischer*). Caso $F_{\text{crit}} > F_{\text{calc}}$, as variâncias são homocedásticas. Caso contrário, serão heterocedásticas (Castro et al., 2012, Majcen e Gegevičius, 2012).

A comparação de médias a partir do agrupamento dos diferentes parâmetros considerados (idade, sexo, etc) foi, então, realizada e avaliada através da aplicação de um teste ANOVA, de fator único.

2.4.3. TESTE DE TUKEY PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

O teste de Tukey permite definir uma diferença mínima entre duas médias que seja significativa, para um determinado nível de significância. Assim, na aplicação deste teste, duas médias serão sempre estatisticamente diferentes se o valor absoluto entre elas for igual ou superior ao valor da diferença mínima significativa calculada (Pocinho, 2009).

2.4.4. TESTE DE LEVENE PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

O teste de Levene permite avaliar diferenças estatisticamente significativas entre médias de dois ou mais grupos, para um determinado nível de significância. Assim, na aplicação deste teste, as médias serão sempre estatisticamente diferentes se o valor calculado for inferior ao *p-value* (Pocinho, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos mediante o tipo de amostra e a caracterização social e médico-legal dos mesmos. A comparação e avaliação da significância estatística dos resultados será efetuada em cada um dos subcapítulos seguintes.

3.1. SANGUE

Os resultados obtidos para a concentração de GHB nas amostras de sangue total encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26 – Concentrações de GHB obtidas para as amostras de sangue analisadas.

ID do caso	[GHB] SG (mg/L)	ID do caso	[GHB] SG (mg/L)
1	5,146	18	4,074
2	7,516	19	10,010
3	1,817	20	8,063
4	4,125	21	8,471
5	3,582	22	7,747
6	6,589	23	15,798
7	2,600	24	9,724
8	3,998	25	5,016
9	2,218	26	7,798
10	2,643	27	8,740
11	7,230	28	11,572
12	7,290	29	6,490
13	6,888	30	7,166
14	7,283	31	3,719
15	5,470	32	6,885
16	3,070	33	9,986
17	9,075	34	9,985

Os resultados obtidos encontram-se todos dentro da gama dos valores considerados endógenos na literatura publicada e já previamente citada. Constatou-se existirem valores mensuráveis em todas as amostras, variando entre um mínimo de 1,817 mg/L e um máximo de 15,798 mg/L. A amostra segue uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk), com uma mediana de 7,027 mg/L. Em suma, os valores

obtidos, quer na generalidade, quer em termos médios, encontram-se abaixo do definido na literatura como referencial para uma presença de origem exógena do GHB, validando a informação relativa a todos os casos estudados, caracterizados pela ausência de suspeita ou de informação relativa ao consumo agudo ou crónico de GHB.

O estudo estatístico efetuado será apresentado especificamente para cada parâmetro de caracterização dos casos.

3.1.1. GÉNERO

O conjunto de amostras estudadas correspondeu a 8 indivíduos do sexo feminino (24%) e 26 indivíduos do sexo masculino (76%). Os valores de GHB em sangue para cada um dos grupos estão apresentados na tabela 27.

Tabela 27 – Valores de GHB em sangue em função do género.

Género	n (%)	[GHB] em sangue (mg/L)
Feminino	8 (24%)	6,716 ± 2,603
Masculino	26 (76%)	7,794 ± 5,039

Valores em médias ± desvio padrão (SD).

Não foi obtida diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,273$), concluindo-se que o género não é um fator de influência significativo para a concentração endógena de GHB em sangue.

3.1.2. IDADE

As amostras ($n=32$, foram excluídas 2 amostras sem identificação da idade) foram divididas em 3 faixas etárias: 1 a 44 anos, 45 a 60 anos e > 61 anos. As concentrações sanguíneas de GHB obtidas nos 3 grupos estão expressas na tabela 28.

Tabela 28 – Valores de GHB em sangue em função da faixa etária.

Faixa etária	n	[GHB] em sangue (mg/L)
1 a 44 anos	5	7,872 ± 2,064
45 a 60 anos	14	6,799 ± 3,666
> 65 anos	13	5,721 ± 2,391

Valores em médias ± desvio padrão (SD).

Apesar de uma tendência para valores inferiores com o aumento da faixa etária, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$, ANOVA seguida de post-hoc teste de Tukey) entre os grupos, sugerindo que a idade não tem influência sobre os níveis sanguíneos de GHB.

3.1.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL MÉDICO-LEGAL

Conforme dito anteriormente, os casos foram organizados em três grupos: acidente, suicídio e causa natural/indeterminada. Não foi incluído qualquer caso de homicídio.

A tabela 29 apresenta a concentração sanguínea de GHB obtida nos 3 grupos.

Tabela 29 – Valores de GHB em sangue em função do diagnóstico diferencial médico-legal.

Diagnóstico	n	[GHB] em sangue (mg/L)
Acidente	8	7,956 ± 2,255
Indeterminada / natural	19	6,745 ± 3,215
Suicídio	7	5,140 ± 2,958

Valores em média ± desvio padrão (SD).

Os dados indicam que nos casos de acidente as concentrações encontradas foram superiores, ao passo que os casos de suicídio apresentaram valores inferiores. Contudo, e não obstante essas tendências, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$; ANOVA seguida de post-hoc teste de Tukey) entre os grupos, sugerindo não haver associação entre os valores de GHB em sangue e a causa de morte nesta população avaliada.

3.1.4. PRESENÇA / AUSÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS

Dos 34 casos, 15 apresentaram resultados negativos para outras substâncias (álcool, substâncias ilícitas e/ou substâncias medicamentosas), ao passo que 19 casos apresentaram positividade para uma ou mais substâncias. Estas encontram-se descritas na tabela 25.

A tabela 30 apresenta a concentração sanguínea de GHB obtida nos 2 grupos.

Tabela 30 – Valores de GHB em sangue em função da ausência ou presença de outras substâncias.

Contexto	n	[GHB] em sangue (mg/L)
Ausência	15	6,37 ± 2,607
Presença	19	6,96 ± 3,381

Valores em média ± desvio padrão (SD).

Os dados indicam que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P=0,405$; teste de t precedido de teste de Levene para igualdade de variâncias) entre os grupos, sugerindo não haver associação entre os valores de GHB em sangue e a ausência ou presença de outras substâncias na amostra.

3.1.5. INTERVALO *POSTMORTEM*

O intervalo *postmortem*, definido como o intervalo entre o momento da morte e a realização da autópsia, é um intervalo por vezes de difícil controlo, quer para efeitos de manutenção das características do cadáver no momento da morte, quer para minimização dos efeitos associados aos fenómenos de autólise e putrefação. Nesse contexto, os casos estudados apresentam PMI entre 0 e 4 dias, tendo sido divididos em 5 grupos. A tabela 31 apresenta as concentrações sanguíneas de GHB obtidas.

Tabela 31 – Valores de GHB em sangue em função do intervalo *postmortem*.

Intervalo (h)	n	[GHB] em sangue (mg/L)
0-24	3	6,359 ± 2,420
24-48	15	6,592 ± 2,723
48-72	8	8,288 ± 4,184
72-96	5	6,357 ± 2,121
96-120	2	4,572 ± 0,812

Valores em média ± desvio padrão (SD).

A figura 9 apresenta uma representação gráfica da variação da concentração sanguínea de GHB em função do intervalo *postmortem*. Verifica-se a existência de valores superiores quando o PMI se situa entre as 48 e as 72 horas, e inferiores para um intervalo superior (96 a 120H), sendo estatisticamente significativas as diferenças encontradas entre alguns dos grupos. Avaliando pormenorizadamente as diferenças entre cada grupo, verifica-se que não são encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com PMI entre 24 horas e 48 horas ($P=0,983$; ANOVA). Em contrapartida, nota-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo das 48 horas e o das 72 horas ($P<0,05$). Em relação aos grupos com PMI superior a 72 horas e 96 horas, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,123$; ANOVA). No entanto, o baixo número de casos com PMI superior a 72 horas ($n=5$) poderá justificar estes resultados, já que o valor de p encontrado se situa muito perto do limite de aceitação de diferença estatisticamente significativa. Em suma, o intervalo *postmortem* aparenta influenciar a concentração de GHB obtida em sangue.

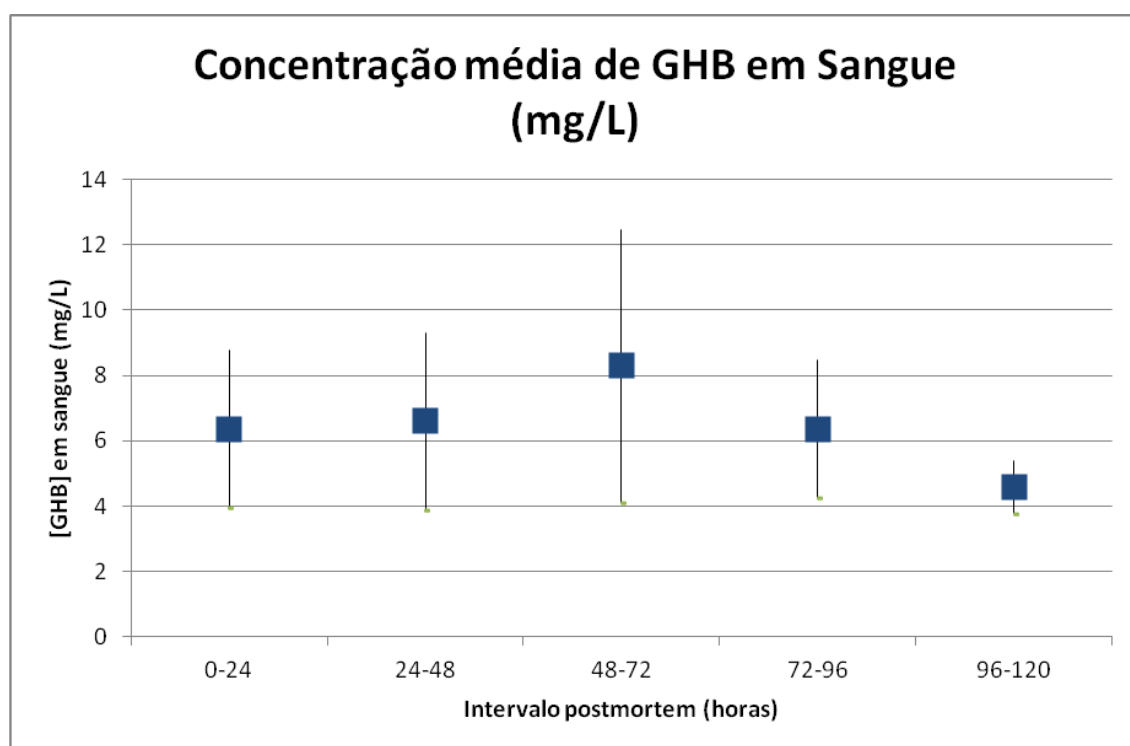


Figura 9 – Representação gráfica da concentração sanguínea de GHB em função do intervalo *postmortem*. Valores em média \pm desvio padrão (SD).

A avaliação do aspeto gráfico e dos valores encontrados sugere uma tendência de comportamento, com o aumento da concentração até às primeiras 48 a 72 horas e diminuição da concentração quando o PMI ultrapassa esta diferença temporal.

Pode também ser verificado que a gama de valores encontrados apresenta uma maior abrangência no intervalo das 48-72 horas, embora o valor mínimo encontrado seja o segundo mais alto de todos, apenas ultrapassado pelo mínimo dos casos com PMI superior a 96 horas. No entanto, o número de casos com este PMI (> 96 horas) é pequeno, pelo que seria necessário uma maior amostragem para uma conclusão mais representativa da realidade *postmortem* neste espaço temporal.

3.2. CABELO

Os resultados obtidos para a concentração de GHB nas amostras de cabelo encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32 – Concentrações de GHB obtidas para as amostras de cabelo analisadas.

ID do caso	[GHB] (ng/mg)	ID do caso	[GHB] (ng/mg)
1	1,02	17	1,34
2	1,74	18	0,44
3	0,98	19	0,25
4	3,12	20	0,36
5	0,27	21	0,58
6	1,62	22	0,16
7	0,41	23	2,56
8	1,08	24	2,62
9	1,28	25	1,32
10	0,86	26	1,57
11	0,61	27	1,94
12	2,57	28	0,44
13	1,01	29	0,37
14	0,52	30	0,38
15	0,39	31	0,31
16	0,42	32	1,78

Constatou-se existirem valores mensuráveis em todas as amostras, variando entre um mínimo de 0,16 ng/mg e um máximo de 3,12 ng/mg. A amostra não segue uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk), com uma mediana de 0,92 ng/mg. Em suma, os valores obtidos, quer na generalidade quer em termos médios, encontram-se abaixo do definido na literatura como referencial para uma presença de origem exógena do GHB, validando a informação relativa a todos os casos estudados, caracterizados pela ausência de suspeita ou de informação relativa ao consumo agudo ou crônico de GHB. Apenas quatro casos apresentam valores ligeiramente superiores a 2 ng/mg. No entanto, Jagerdeo *et al.* (2015), sugerem que este valor não será ainda consensual, visto terem detetado valores que ultrapassam esta referência em casos reais com ausência de consumo de GHB.

O estudo estatístico efetuado será apresentado especificamente para cada parâmetro de caracterização dos casos.

3.2.1. GÉNERO

O conjunto de amostras estudadas é constituído por 5 indivíduos do sexo feminino (16%) e 27 indivíduos do sexo masculino (84%). Os valores de GHB em sangue para cada um dos grupos estão apresentados na tabela 33.

Tabela 33 – Valores de GHB em cabelo em função do género.

Género	n (%)	[GHB] em cabelo (ng/mg)
Feminino	5 (16%)	0,60 ± 0,574
Masculino	27 (84%)	1,16 ± 0,832

Valores em médias ± desvio padrão (SD).

Não foi obtida diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,160$), concluindo-se que o género não é um fator de influência significativo para a concentração endógena de GHB em cabelo.

3.2.2. IDADE

As amostras foram divididas em 3 faixas etárias: 1 a 44 anos, 45 a 60 anos e > 61 anos. As concentrações sanguíneas de GHB obtidas nos 3 grupos estão expressas na tabela 34.

Tabela 34 – Valores de GHB em cabelo em função da faixa etária.

Faixa etária	n	[GHB] em cabelo (ng/mg)
1 a 44 anos	9	1,40 ± 0,811
45 a 60 anos	11	1,14 ± 0,773
> 65 anos	12	0,76 ± 0,811

Valores em médias ± desvio padrão (SD).

Apesar de uma tendência para valores inferiores com o aumento da faixa etária, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$, ANOVA seguida de post-hoc teste de Tukey) entre os grupos, sugerindo que a idade não tem influência sobre os níveis sanguíneos de GHB.

Note-se que o valor médio apresenta uma tendência para redução, à medida que a faixa etária aumenta, mesmo considerando a existência de um valor máximo mais elevado na faixa etária dos 45-60 anos. Este comportamento é compatível com o obtido nas amostras de sangue.

3.2.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL MÉDICO-LEGAL

Uma vez mais, os casos foram organizados em três grupos: acidente, suicídio e causa natural/indeterminada. Não foi incluído qualquer caso de homicídio.

A tabela 35 apresenta a concentração de GHB em cabelo obtida nos 3 grupos.

Tabela 35 – Valores de GHB em cabelo em função do diagnóstico diferencial médico-legal.

Diagnóstico	n	[GHB] em cabelo (ng/mg)
Acidente	8	1,32 ± 0,695
Indeterminada / natural	17	1,16 ± 0,744
Suicídio	7	0,92 ± 0,901

Valores em média ± desvio padrão (SD).

Os dados indicam que nos casos de acidente as concentrações encontradas foram superiores, e inferiores nos casos de suicídio. Contudo, não obstante essas tendências, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0,05$; ANOVA seguida de post-hoc teste de Tukey) entre os grupos, sugerindo não haver associação entre os valores de GHB em cabelo e a causa de morte nesta população avaliada.

3.2.4. INTERVALO *POSTMORTEM*

Os casos estudados apresentam PMI entre 0 e 4 dias, tendo sido divididos em 5 grupos. A tabela 36 apresenta as concentrações obtidas para o GHB em cabelo.

Tabela 36 – Valores de GHB em cabelo em função do intervalo *postmortem*.

Intervalo (h)	n	[GHB] em cabelo (ng/mg)
0-24	4	$0,98 \pm 1,068$
24-48	16	$1,25 \pm 0,934$
48-72	3	$0,78 \pm 0,843$
72-96	6	$0,68 \pm 0,346$
96-120	3	$1,32 \pm 0,300$

Valores em média \pm desvio padrão (SD).

A figura 10 apresenta uma representação gráfica da variação da concentração em cabelo de GHB em função do intervalo *postmortem*.

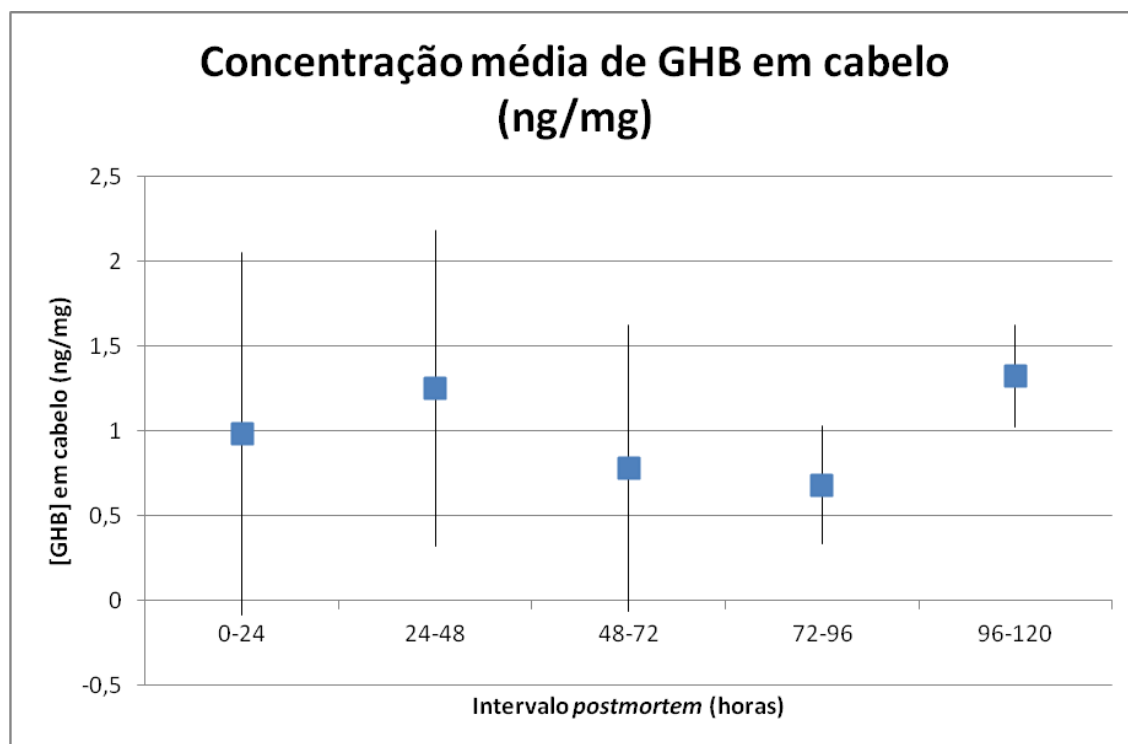


Figura 10 – Representação gráfica da concentração de GHB em cabelo, em função do intervalo *postmortem*. Valores em média \pm desvio padrão (SD).

Contrariamente aos resultados obtidos no sangue, não se afigura uma tendência definida para um padrão de comportamento da concentração de GHB no cabelo à medida que aumenta o intervalo *postmortem*.

A análise de variâncias e o teste de Tukey evidenciam a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,605$).

3.2.5. PRESENÇA / AUSÊNCIA DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS

Dos casos estudados, 13 apresentaram resultados negativos para outras substâncias (álcool, substâncias ilícitas e/ou substâncias medicamentosas), ao passo que 19 casos apresentaram positividade para uma ou mais substâncias. Estas encontram-se descritas na tabela 25. A tabela 37 apresenta a concentração de cabelo de GHB obtida nos 2 grupos.

Tabela 37 – Valores de GHB em cabelo em função da ausência ou presença de outras substâncias.

Contexto	n	[GHB] em cabelo (ng/mg)
Ausência	13	$1,14 \pm 0,817$
Presença	19	$1,03 \pm 0,834$

Valores em média \pm desvio padrão (SD).

Os dados indicam que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P=0,975$; teste de t precedido de teste de Levene para igualdade de variâncias) entre os grupos, sugerindo não haver associação entre os valores de GHB em cabelo e a ausência ou presença de outras substâncias na amostra.

Conclui-se que a presença ou ausência de outras substâncias não é um fator influenciador da concentração de GHB determinada em cabelo.

3.3. RAZÃO CABELO/SANGUE

A obtenção da razão entre os valores obtidos no cabelo e no sangue foi efetuada através da operação aritmética de divisão direta dos dois valores referidos. Foram selecionados 28 casos com disponibilidade das duas amostras. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 38.

Tabela 38 – Razão de concentrações de GHB no cabelo e no sangue obtidas nos casos analisados.

ID do caso	Razão [GHB] cabelo / sangue	ID do caso	Razão [GHB] cabelo / sangue
1	0,20	15	0,07
2	0,13	16	0,14
3	1,71	17	0,15
4	0,04	18	0,11
5	0,74	19	0,03
6	0,41	20	0,04
7	0,18	21	0,07
8	0,41	22	0,01
9	0,18	23	0,07
10	0,12	24	0,27
11	0,09	25	0,31
12	0,13	26	0,25
13	0,04	27	0,10
14	0,07	28	0,05

Com o estudo do comportamento das razões, pretendeu-se verificar a possibilidade de se obter algum tipo de informação suplementar que as amostras de cabelo e de sangue total, isoladamente, não sejam capazes de transmitir.

Nos itens acima, foi verificado que apenas as amostras de sangue total apresentam um comportamento diferenciado com o PMI, com a obtenção de médias com diferenças estatisticamente significativas para os cinco primeiros dias de PMI. Nesse sentido, avaliou-se o comportamento das razões das amostras considerando o PMI.

3.3.1. INTERVALO *POSTMORTEM*

Os casos estudados apresentam PMI entre 0 e 4 dias, tendo sido divididos em 5 grupos. A tabela 39 apresenta as concentrações obtidas para o GHB em cabelo.

Tabela 39 – Valores dos ratios das amostras estudadas em função do intervalo *postmortem*.

Intervalo (h)	n	[GHB] em cabelo (ng/mg)
0-24	4	0,18 ± 0,071
24-48	14	0,50 ± 0,861
48-72	2	0,12 ± 0,141
72-96	5	0,31 ± 0,290
96-120	2	0,60 ± 0,297

Valores em médias ± desvio padrão (SD).

A análise de variâncias e o teste de tukey evidenciam a inexistência de uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,845$). Contrariamente aos resultados obtidos no sangue, não se afigura uma tendência definida para um padrão de comportamento da concentração de GHB no cabelo à medida que aumenta o intervalo *postmortem*.

4. COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES

Conforme referido no Capítulo II da Parte I, a evolução da formação/degradação de GHB em amostras biológicas *postmortem* foi avaliada maioritariamente em condições *in vitro*.

Considerando a causa de morte, os resultados obtidos são consonantes com os publicados por Elliott (2004), cujas conclusões não apresentaram qualquer correlação entre a causa de morte e as concentrações de GHB obtidas.

A informação relativa ao comportamento do composto *postmortem*, mas previamente à recolha das amostras da vítima é ainda pouca, muito embora alguns estudos tenham tentado abordar a avaliação do GHB como possível marcador de determinação do intervalo *postmortem* (PMI).

Assim, Richard *et al.* (2005) desenvolveram um estudo em ratinhos (n=4), armazenados a duas temperaturas diferentes (15°C e 20°C), onde ficou demonstrado um aumento linear de GHB em amostras de cérebro e sangue total nas primeiras 104 horas (5 dias), amostras essas recolhidas de doze em doze horas, à exceção do 1º dia, em que foram recolhidas de 6 em 6 horas. No sangue total, a concentração de GHB passou de aproximadamente 0 (zero) µg/g para aproximadamente 40 µg/g a 20°C, ao passo que, a 15°C, a concentração de GHB passou de aproximadamente 5 µg/g para cerca de 25 µg/g (Richard *et al.*, 2005).

Moriya e Hashimoto (2004) sugerem, baseados no estudo de comportamento do GHB *in vitro* (em armazenamento após recolha de amostras *postmortem*) que as alterações na concentração de GHB surgem, em grande parte, entre o momento da morte e a autópsia do cadáver, desde que, posteriormente a esse segundo momento, as amostras sejam armazenadas em condições apropriadas, nomeadamente em termos de refrigeração e de adição de preservantes, conforme sugerido e discutido no capítulo III da Parte I.

Moriya e Hashimoto (2005) fizeram igualmente a determinação da concentração de GHB para um conjunto de amostras com PMI inferior a 48 horas, tendo sido obtida uma média de 4,6 mg/L em amostras de sangue periférico, com um valor máximo de 11,6 mg/L.

Busardo *et al.* (2014) avaliaram os resultados de três grupos de amostras, divididas de acordo com o PMI. Nesses três grupos, com PMI médios de 27 horas, 59 horas e 142 horas, foi verificado um aumento da concentração de GHB, com um valor médio de 2,14 mg/L, 5,13 mg/L e 11,8 mg/L, respetivamente. Estes valores são compatíveis com os encontrados no nosso trabalho, com uma média mínima de 4,57 mg/L e uma média máxima de 8,29 mg/L.

Complementarmente, Elliott *et al.* (2004) sugerem, após um estudo debruçado sobre amostras putrefactas (escolhidas após observação morfológica e a presença de compostos indicadores da putrefação), que o nível de putrefação não apresenta uma relação proporcional com o valor obtido de GHB para cada amostra.

Korb e Cooper (2014) sugerem igualmente a possível importância do PMI como fator influenciador da concentração de GHB *postmortem*. No entanto, assumindo a falta de objetividade e possibilidade de confirmação da informação relativa à data da morte dos casos estudados, não lhes foi possível avaliar, em termos quantitativos, um padrão de comportamento da concentração de GHB nas amostras estudadas, quando associado ao PMI.

Assim, embora com algumas diferenças, é notório um determinado padrão de comportamento do GHB em contexto *postmortem*, já que se verifica sempre uma fase inicial de aumento da concentração que poderá ir até às 72 horas, em média, mediante o estudo agora desenvolvido, culminando numa segunda fase de diminuição da concentração até valores que poderão estar abaixo dos iniciais.

A possibilidade de monitorização deste comportamento pode ser considerada através da utilização de alíquotas armazenadas e expostas a uma determinada gama de temperaturas ambientes, nomeadamente entre os 15°C e os 20°C, com análise regular e sistemática em tempos intermédios. Desse modo, poderá ser possível verificar o comportamento de cada amostra em concreto, inferindo-se o padrão de comportamento do GHB, com posterior possibilidade de aplicação de uma régua temporal até aos 5 dias, de acordo com o aqui descrito.

A utilização paralela de amostras alternativas, nomeadamente de cabelo, pode permitir um esclarecimento suplementar na interpretação dos resultados obtidos no sangue total, já que a amostra não sofre de igual modo a influência da variação *postmortem* que o sangue apresenta. Assim, a análise de uma amostra de cabelo permitirá verificar de forma mais fidedigna a possibilidade de consumo de GHB, bem como a aferição com a amostra de sangue e posterior interpretação médico-legal.

A fundamentação de uma interpretação médico-legal tem diversos pressupostos a ser considerados que vêm enriquecer não só esta como a própria evolução dos critérios técnico-científicos aplicados. Nesse sentido, os próprios pressupostos, definições e conceitos, não só teóricos (de aplicação prática direta) vão evoluindo à medida que mais se vai sabendo e aprofundando o conhecimento, independentemente da área em apreço.

A disponibilização desta mesma informação, de modo cumulativo, permitirá melhorar a capacidade de interpretação por parte do perito, de forma mais consciente, fundamentada e enriquecida, quer na dualidade da origem do GHB determinado quer na avaliação e proposta de um PMI compatível com a informação associada ao caso. Nesse sentido, e considerando que o número de casos estudados poderá ser ainda curto, a representatividade de uma amostra médico-legal deverá ser aumentada, monitorizada e aprofundada, para conclusões ainda mais robustas no que diz respeito aos valores de GHB no sangue de acordo com o PMI.

Capítulo IV – Determinação de GHB *Antemortem* e *Postmortem* em Sangue e Pêlo após Exposição Pontual e Repetida em Rato

1. INTRODUÇÃO

Conforme anteriormente referido, o comportamento característico do GHB, em contexto endógeno e exógeno, apresenta dificuldades de interpretação médico-legal. Uma possibilidade de obviar essas dificuldades é a análise multi-amostra, no sentido de se poder comprovar a presença do composto em concentrações consentâneas e complementares, coadjuvantes de conclusões médico-legais fundamentadas.

O perfil farmacocinético do composto e a sua capacidade de distribuição/aparecimento em diferentes órgãos/tecidos será um indicador importante para a monitorização do comportamento do composto em contexto real, quer de consumo exógeno quer de origem endógena. A utilização de modelos animais, nos quais podemos modular as condições de estudo, pode constituir uma grande vantagem para este tipo de estudos farmacológicos/toxicológicos, ajudando a ultrapassar limitações inerentes à utilização de amostras biológicas humanas, tanto *antemortem* como *postmortem*.

O trabalho experimental apresentado neste capítulo teve como principal objetivo a quantificação de GHB em amostras de sangue e de pêlo de ratos submetidos a tratamento pontual (toma única) e repetido (14 dias). Pretendeu-se a obtenção de valores de referência para casos positivos (ratos tratados) e negativos (controlo), bem como de intervalo de tempo mais favorável entre a recolha de amostra e a identificação do composto, e ainda tentar definir *razões* (pêlo/sangue) putativamente indicativas de consumo ou de origem endógena.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar do sexo masculino, com um peso médio de cerca de 350g, adquiridos à Charles River Laboratories (Barcelona). À chegada ao laboratório, os animais foram sujeitos a um período de habituação de 2 semanas, e mantidos em gaiolas ventiladas (dois animais por gaiola), sob um ciclo de dia/noite de 12h/12h, e temperatura (21-22°C) e humidade (40-50%) controladas. Os ratos foram alimentados com ração padrão (IPM-R20, Letica, Barcelona) e acesso livre a água de bebida. Toda a experimentação animal foi desenvolvida de acordo com as diretivas do Conselho da Europa para o bem-estar animal e as regulamentações das autoridades nacionais, incluindo a necessária acreditação das instalações (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e dos investigadores (Felasa C) para a execução de investigação experimental em animais.

2.2. MODELO ANIMAL: PROTOCOLOS E GRUPOS EM ESTUDO

Antes de proceder aos tratamentos pontual (toma única) e repetido (14 dias), iniciou-se a parte experimental com a elaboração de um estudo farmacocinético preliminar. Neste protocolo, foi administrada oralmente, através de cânula esofágica, uma dose única (500 mg/kg peso de rato) de GHB (Xyrem®, UCB Pharma Lda, Berkshire, Reino Unido). As amostras de sangue e de pêlo foram colhidas nos ratos sob o efeito de anestesia intraperitoneal a 2 mg/kg peso na proporção 2:1 (v:v) com 50 mg/mL de cetamina (Ketalar®, Parke-Davis, Lab. Pfizer Lda, Seixal, Portugal) e uma solução a 2,5% de clorpromazina (Largactil®, Rhône-Poulenc Rorer, Lab. Vitória, Amadora, Portugal). Recolheram-se amostras do tempo inicial (T0), antes da administração do GHB, e em diferentes tempos após a administração, nomeadamente 2, 4, 6 e 24 horas. Foram recolhidas 5 amostras em cada tempo de estudo.

O protocolo seguido para os estudos pontual (toma única) e repetido (14 dias) encontra-se esquematizado na figura 11. Em relação à exposição pontual, um outro grupo de ratos (n=5) recebeu também uma dose oral única de GHB (500 mg/kg peso de rato), para recolha de amostras de sangue e pêlo 24, 48 e 72 horas *postmortem*, sendo o sacrifício efetuado duas horas após a toma, e os animais conservados a 4°C ao longo do tempo de estudo *postmortem*.

Para a avaliação de valores associados a um consumo mais prolongado, imitando uma situação de tomas repetidas, os animais receberam uma dose diária de 500 mg/Kg de peso de GHB uma vez por dia, durante 14 dias. Um grupo (n=5) foi sacrificado no último dia de consumo e foram recolhidas amostras de sangue e pêlo às 24, 48 e 72 horas *postmortem*. Outro grupo (n=5) foi sacrificado 14 dias após o último consumo, intervalo de tempo consentâneo com a metabolização total do GHB exógeno. Foram feitas recolhas de amostras de pêlo e sangue *in vivo* no dia 7 e *postmortem* no dia 14.

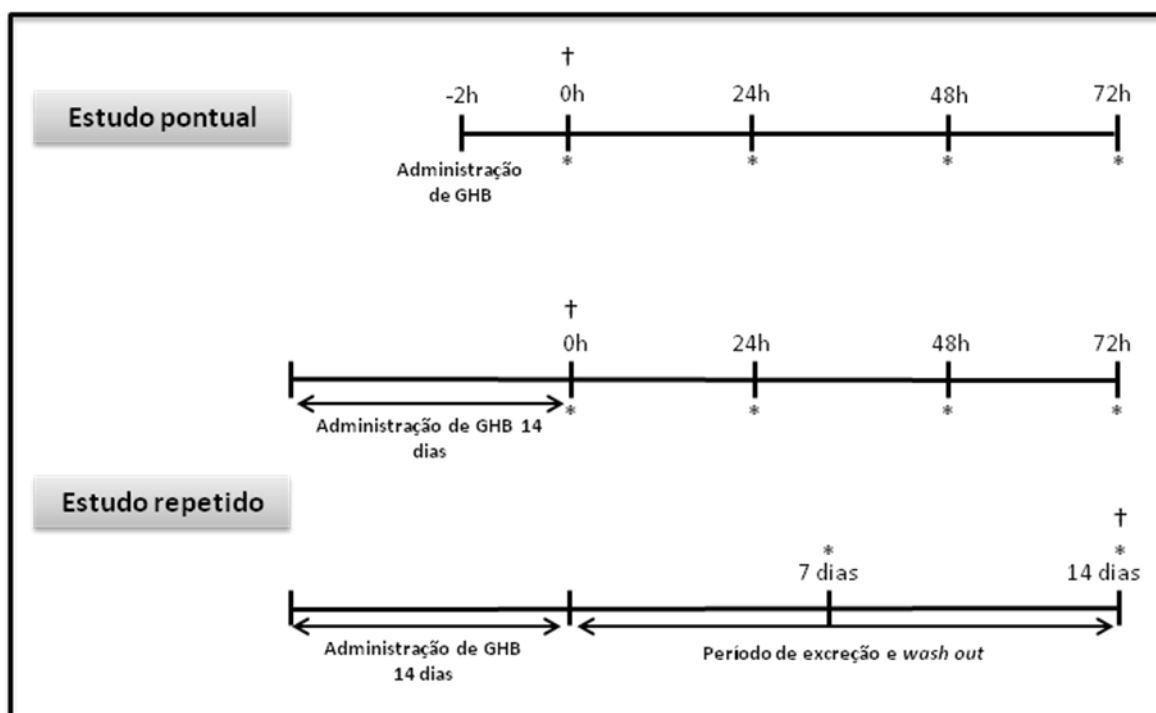


Figura 11 – Protocolo experimental dos estudos pontual e repetido. †, Sacrifício; *, recolha de amostras de sangue e pêlo (n=5 em cada tempo de recolha).

2.3. COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram recolhidas por punção da veia jugular, para microtubos do tipo eppendorf, com adição simultânea de fluoreto de sódio, e congeladas a -20°C até à sua utilização e análise instrumental, de acordo com o referido no Ponto 4 do Capítulo II da Parte I.

As amostras de pêlo foram recolhidas utilizando tesouras de tecidos biológicos, em aço inox, para tubos do tipo eppendorf, e armazenadas em local seco e fechado, até ao início do processamento analítico.

2.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE GHB

As amostras de sangue foram preparadas de acordo com o Ponto 1.1.4 do Capítulo II da Parte III e processadas analiticamente segundo o Ponto 4.4 do Capítulo III da Parte I.

As amostras de pêlo foram preparadas de acordo com o Ponto 1.2.2 do Capítulo II da Parte III e processadas analiticamente segundo o Ponto 4.4 do Capítulo III da Parte I.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística consistiu na aplicação do teste t de *student* e, se necessário, de um teste de análise de variâncias (teste ANOVA), para cada parâmetro estudado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PERFIL FARMACOCINÉTICO APÓS TOMA ÚNICA

A análise das amostras de sangue deu origem aos resultados descritos na tabela 40.

Tabela 40 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha

Rato/ Tempo (h)	T0	T2	T4	T6	T24
Rato 1	0,06	27,63	4,58	0,60	0,02
Rato 2	0,03	17,48	1,91	0,01	0,03
Rato 3	0,02	12,98	2,04	3,92	0,10
Rato 4	0,03	29,86	1,41	0,70	0,04
Rato 5	0,02	2,020	4,17	0,89	0,07
Média ± epm	0,03 ± 0,006	17,99 ± 5,07	2,82 ± 0,65	1,23 ± 0,69	0,05 ± 0,015

A figura 12 apresenta a curva de concentração sanguínea de GHB obtida em função do tempo após a toma.

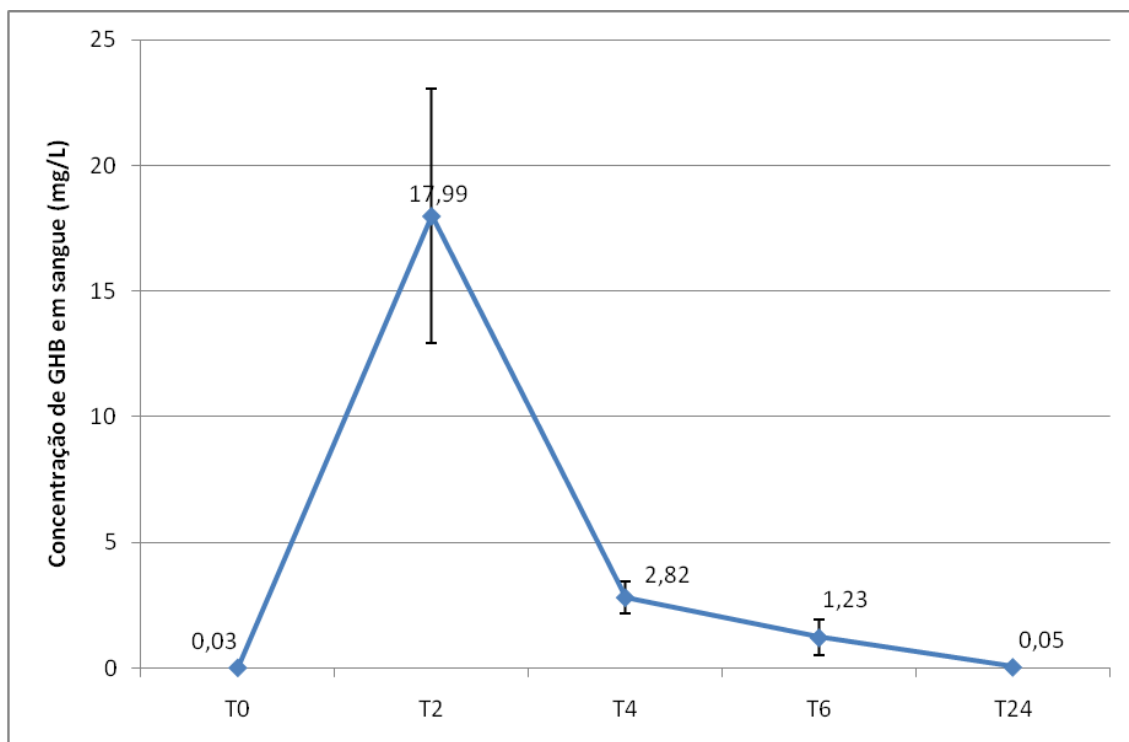


Figura 12 – Evolução da concentração sanguínea de GHB (mg/L) em função do tempo após a toma. Dados em média ± epm (n=5 por tempo).

Os dados obtidos mostram um pico de concentração de GHB ($C_{max} = 17,99 \pm 5,07$ mg/L) duas horas após a toma única, sendo este o t_{max} , seguindo-se uma rápida diminuição nas horas seguintes. Constata-se que 24 horas após a toma os valores obtidos ($0,05 \pm 0,015$ mg/L) são da mesma ordem de grandeza dos níveis endógenos encontrados previamente à toma de GHB ($T0 = 0,03 \pm 0,006$ mg/L).

Como primeira nota interpretativa, e em consonância com o descrito na literatura (Couper e Marinetti, 2002), as primeiras 6 horas parecem ser fundamentais para a obtenção de resultados significativos e comprovantes de consumo exógeno de GHB, no que a amostras de sangue diz respeito.

3.2. COMPORTAMENTO *POSTMORTEM* APÓS TOMA ÚNICA

3.2.1. AMOSTRAS DE SANGUE

Os resultados obtidos nas colheitas de sangue efectuadas no momento do sacrifício (T0) e 24, 48 e 72 horas *postmortem*, em animais sacrificados 2h após uma toma única de GHB, estão descritos na tabela 41.

Tabela 41 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha *postmortem*

Rato/ Tempo (h)	T0	T24	T48	T72
Rato 1	25,50	224,10	77,60	301,20
Rato 2	67,70	168,60	66,10	231,90
Rato 3	8,10	11,30	24,40	100,70
Rato 4	83,90	35,10	62,00	22,50
Rato 5	1,50	58,30	128,90	203,10
Média \pm epm	$37,34 \pm 16,39$	$99,49 \pm 41,18$	$71,81 \pm 20,32$	$171,88 \pm 49,35$

Na figura 13 está graficamente representada a evolução da concentração sanguínea de GHB em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*).

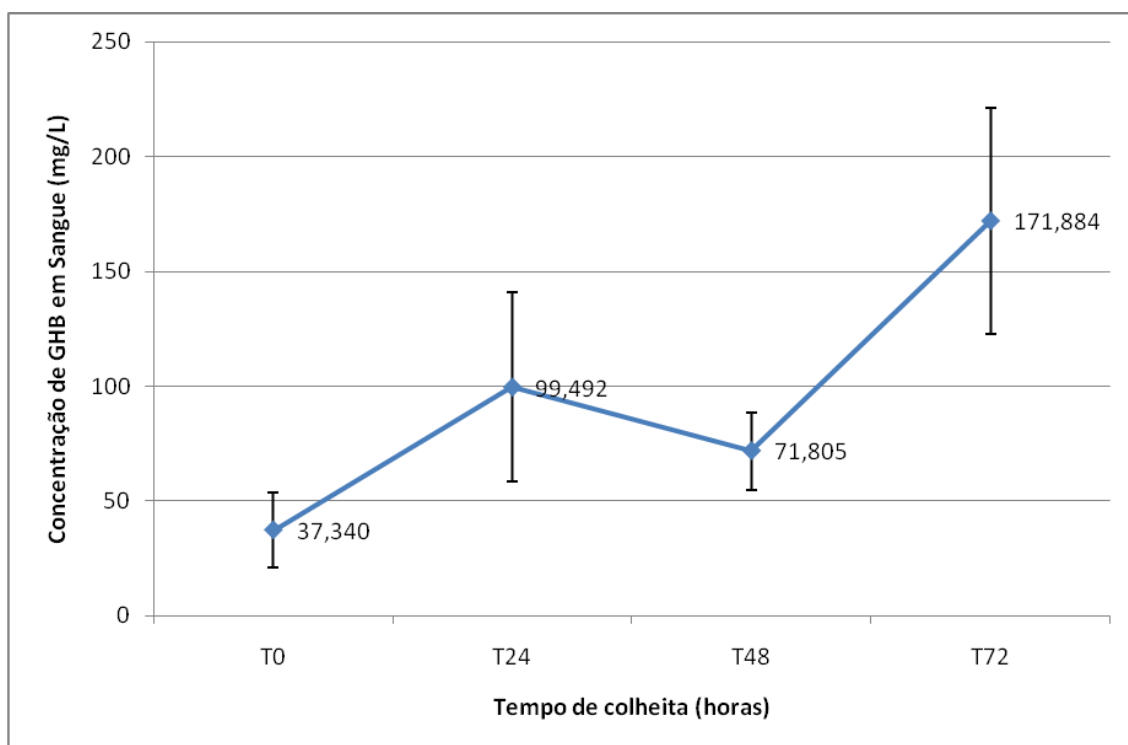


Figura 13 – Evolução da concentração sanguínea de GHB (mg/L) em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) em animais submetidos a uma toma única de GHB e sacrifício 2h após. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

A concentração de GHB obtida no T0 ($37,34 \pm 16,39$ mg/L), período correspondente a uma colheita imediatamente após o sacrifício, em animais submetidos a uma única toma e sacrificados 2h após a administração, é da mesma ordem de grandeza da obtida no grupo de ratos do estudo farmacocinético aos quais foi administrada a mesma dose única de GHB e colhido sangue 2h após a toma ($17,99 \pm 5,07$ mg/L). Deve ainda realçar-se a evolução da concentração sanguínea de GHB com o aumento do período *postmortem*, verificando-se valores superiores às 24h, seguidos de um *plateau* até às 48h, registando-se posteriormente novo aumento acentuado nas 72 horas *postmortem*. Equaciona-se a possibilidade de fenómenos de redistribuição ou síntese *postmortem* que serão abordados na discussão em conjunto com os restantes dados obtidos.

3.2.2. AMOSTRAS DE PÊLO

Os resultados obtidos nas amostras de pêlo colhidas no momento do sacrifício (T0) e 24, 48 e 72 horas *postmortem*, em animais sacrificados 2h após uma toma única de GHB, estão descritos na tabela 42.

Tabela 42 – Concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*

Rato/ Tempo (h)	T0	T24	T48	T72
Rato 1	1,47	1,08	0,83	1,66
Rato 2	1,03	0,94	1,08	1,06
Rato 3	0,58	1,27	0,75	0,76
Rato 4	1,09	0,88	1,08	0,69
Rato 5	2,21	1,16	0,79	0,80
Média ± epm	1,28 ± 0,27	1,07 ± 0,07	0,91 ± 0,07	0,99 ± 0,18

A figura 14 representa graficamente a evolução da concentração de GHB em pêlo em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*).

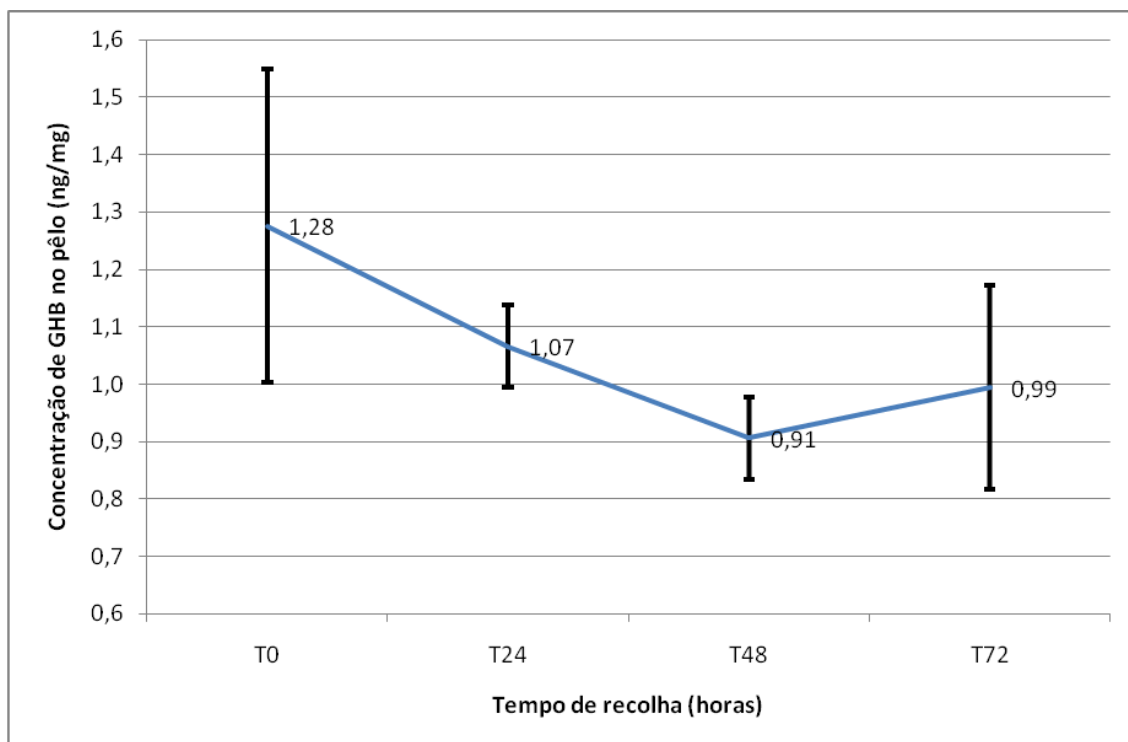


Figura 14 – Evolução da concentração de GHB em pêlo (ng/mg) em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) em animais submetidos a uma toma de GHB e sacrifício 2h após. Dados em média ± epm (n=5 por tempo).

A análise dos dados obtidos permite inferir que numa situação de toma única, a concentração de GHB nas amostras de pêlo não é significativamente influenciada pelo intervalo *postmortem* ($P=0,484$).

3.2.3. RAZÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE GHB EM PÊLO E EM SANGUE

Foi calculada a razão entre a concentração de GHB em pêlo e a obtida em sangue, para ser usada como possível indicador de consumo ou de conteúdo endógeno.

i) – Razão pêlo/sangue

As razões calculadas para as amostras de pêlo/sangue colhidas no T0 e após 24, 48 e 72 horas *postmortem* estão descritos na tabela 43.

Tabela 43 – Razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) e a obtida em amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha *postmortem*

Rato/ Tempo (h)	T0	T24	T48	T72
Rato 1	0,058	0,005	0,011	0,006
Rato 2	0,023	0,006	0,016	0,005
Rato 3	0,072	0,112	0,031	0,008
Rato 4	0,020	0,025	0,017	0,031
Rato 5	1,432	0,020	0,006	0,004
Média ± epm	0,321 ± 0,278	0,033 ± 0,020	0,016 ± 0,004	0,010 ± 0,005

A figura 15 representa graficamente a evolução da razão entre as concentrações de GHB em pelo e em sangue em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*).

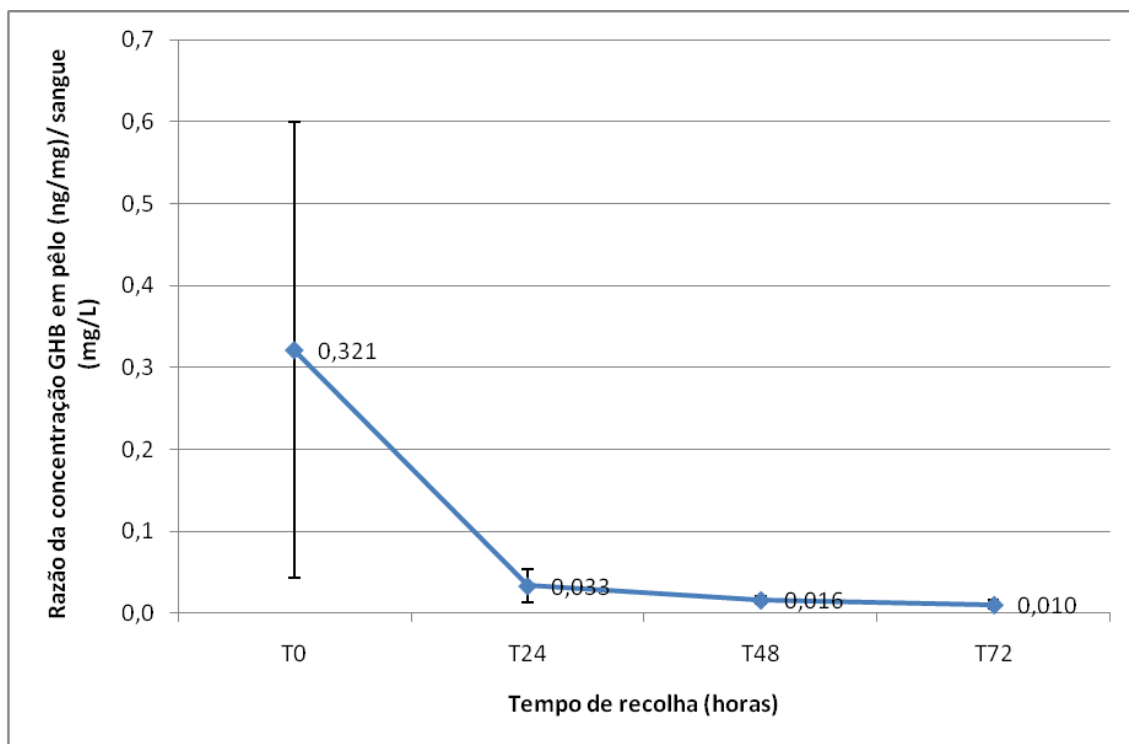


Figura 15 – Evolução da razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) e a obtida em amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha postmortem. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

ii) – Razão sangue/pêlo

As razões calculadas para as concentrações de GHB em amostras de sangue e de pêlo colhidas no T0 e após 24, 48 e 72 horas *postmortem* estão descritos na tabela 44.

Tabela 44 – Razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) e de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*

Rato/ Tempo (h)	T0	T24	T48	T72
Rato 1	17,31	207,50	93,54	181,47
Rato 2	43,47	179,39	61,21	218,81
Rato 3	13,95	8,93	32,50	132,45
Rato 4	49,21	39,89	57,44	32,55
Rato 5	0,70	50,25	163,11	253,91
Média \pm epm	24,93 \pm 9,22	97,19 \pm 40,13	81,56 \pm 22,58	163,84 \pm 38,51

A figura 16 representa graficamente a evolução da razão entre as concentrações de GHB em sangue e em pêlo em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*).

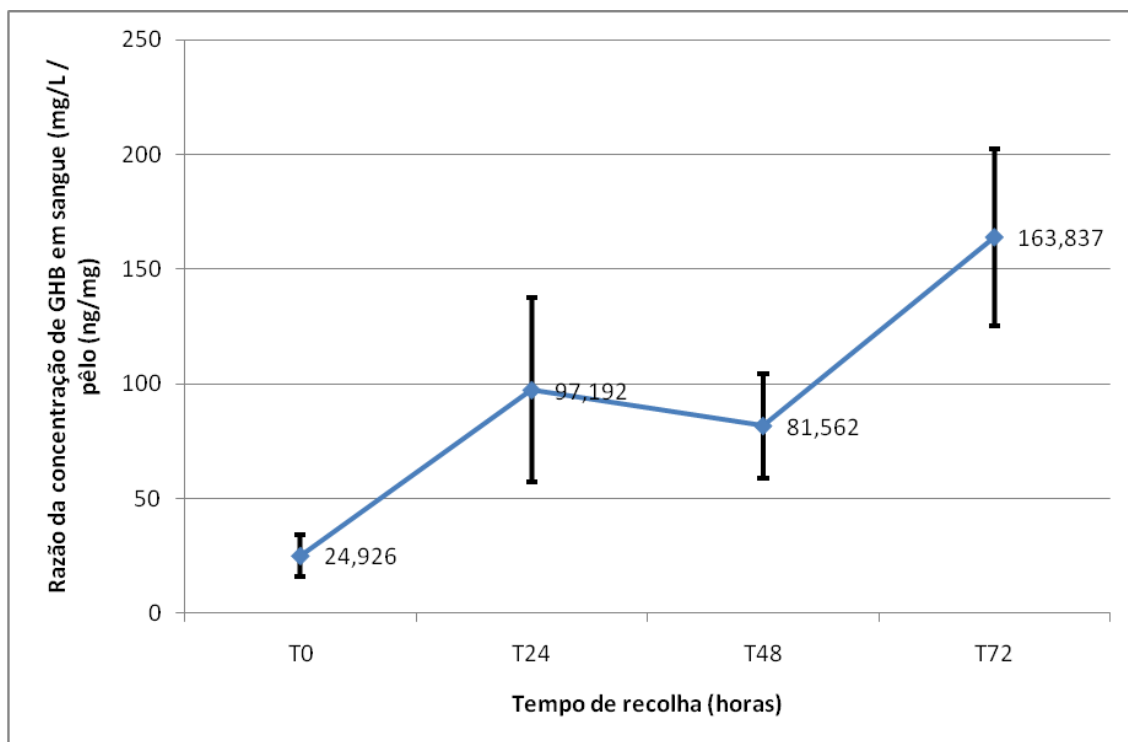


Figura 16 – Evolução da razão entre a concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) e pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

A utilização de uma das *razões* poderá originar uma interpretação de cada caso facilitadora da determinação do intervalo *postmortem*. A razão sangue/pêlo aparenta permitir essa possibilidade, já que encontramos gamas de valores distinguíveis, de acordo com o PMI.

Em contrapartida, os valores obtidos para a *razão* pêlo/sangue serão de utilização menos intuitiva, já que as diferenças entre os valores médios obtidos não parecem fornecer indicações fiáveis para cálculo do PMI.

3.3. COMPORTAMENTO *POSTMORTEM* APÓS CONSUMO REPETIDO

3.3.1. AMOSTRAS DE SANGUE

Conforme referido acima, o grupo de ratos adstrito a um consumo repetido de GHB foi dividido em dois subgrupos. O primeiro subgrupo foi sacrificado duas horas após o último consumo. Os resultados obtidos nas colheitas de sangue efetuadas no momento do sacrifício (T0) e 24, 48 e 72 horas *postmortem*, estão descritos na tabela 45.

Tabela 45 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha

Rato/ Tempo (h)	T0	T24	T48	T72
Rato 1	22,28	14,12	139,88	62,49
Rato 2	49,57	29,45	48,01	23,79
Rato 3	20,09	22,38	134,32	265,49
Rato 4	12,17	17,51	278,60	*
Rato 5	12,44	17,87	211,06	327,98
Média ± epm	23,31 ± 6,87	20,26 ± 2,64	162,37 ± 38,89	169,94 ± 74,73

*O estado de decomposição do rato 4 inviabilizou a recolha de sangue às 72 horas.

A evolução da concentração sanguínea de GHB em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) está representada graficamente na figura 17.

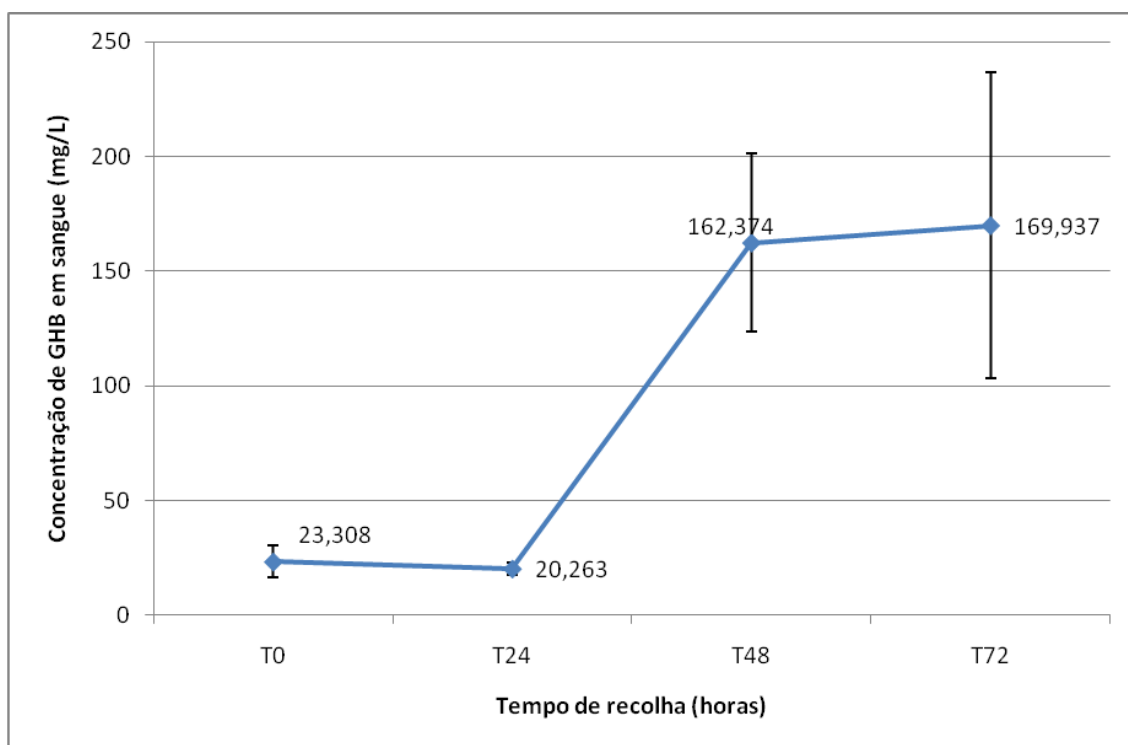


Figura 17 – Evolução da concentração sanguínea de GHB (mg/L) em função do tempo decorrido após a morte (período *postmortem*) em animais submetidos a consumo repetido de GHB e sacrifício 2h após a última toma. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

A concentração de GHB obtida no T0 ($23,31 \pm 6,87$ mg/L), duas horas após a última toma e imediatamente após o sacrifício dos animais, é novamente consentânea com o valor obtido no grupo incluído no estudo farmacocinético, sendo os valores da mesma ordem de grandeza. Constatou-se, ainda, não existir uma variação nas concentrações de GHB obtidas às 0 e às 24 horas *postmortem*; contudo, níveis substancialmente mais elevados foram verificados às 48, mantendo-se aumentados até às 72 horas *postmortem* (figura 17).

O segundo grupo de ratos do estudo repetido, sacrificado 14 dias após o último consumo, apresentou valores de GHB substancialmente mais reduzidos quando comparados com o grupo de ratos do mesmo estudo, mas sacrificado logo após a última toma. Os resultados obtidos para os tempos de recolha de 7 e 14 dias após o último consumo são apresentados na tabela 46.

Tabela 46 – Concentração de GHB obtida nas amostras de sangue (em mg/L) nos diversos tempos de recolha

Rato/ Tempo (h)	7 dias	14 dias
Rato 1	0,179	0,075
Rato 2	0,081	0,071
Rato 3	0,136	0,079
Rato 4	0,112	0,091
Rato 5	0,078	0,051
Média ± epm	0,117 ± 0,019	0,073 ± 0,007

Uma vez mais, regista-se a obtenção de valores coadunando-se com um contexto endógeno, com concentrações da ordem dos nanogramas por mililitro de sangue, em contraponto ao grupo de animais sacrificado após o último consumo que apresentava valores na ordem das dezenas de microgramas por mililitro.

3.3.2. AMOSTRAS DE PÊLO

Os resultados obtidos nas amostras de pêlo colhidas no momento do sacrifício (T0) e 24, 48 e 72 horas *postmortem*, estão descritos na tabela 47.

Tabela 47 – Concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha *postmortem*

Rato/ Tempo (h)	T0	T24	T48	T72
Rato 1	47,15	22,60	48,82	22,91
Rato 2	29,79	-	63,06	57,19
Rato 3	45,25	28,99	69,61	67,86
Rato 4	60,47	-	52,01	34,98
Rato 5	76,16	38,21	54,95	74,98
Média ± epm	51,76 ± 7,80	29,93 ± 4,53	57,69 ± 3,80	51,58 ± 9,85

A figura 18 apresenta o gráfico representativo da concentração de GHB em pêlo nos diversos tempos de recolha *postmortem*.

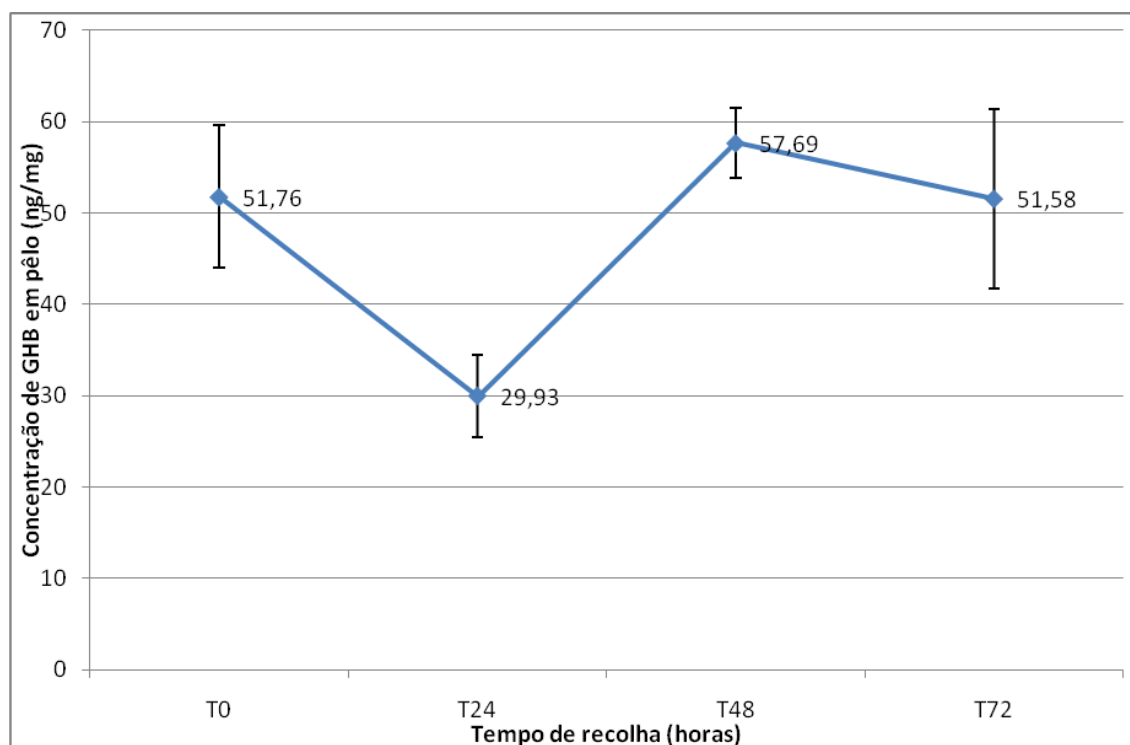


Figura 18 – Concentração de GHB (ng/mg) em pêlo nos diversos tempos de recolha *postmortem*. Dados em média \pm epm (n=5 por tempo).

A análise dos dados obtidos permite inferir que numa situação de consumo repetido, a concentração de GHB nas amostras de pêlo não é significativamente influenciada pelo intervalo *postmortem* ($P=0,160$), apenas se verificando um valor tendencialmente inferior nas amostras recolhidas 24 horas após o sacrifício (figura 18).

Este comportamento afigura-se, novamente, como contraponto às diferenças verificadas nas amostras de sangue, nas quais se detetou um aumento dos valores para períodos *postmortem* mais alargados (48 e 72 horas). Porém, a ordem de grandeza dos valores obtidos sugere a possibilidade de se poder utilizar a concentração de GHB no pêlo como indicador de consumo crónico, quando comparado com os valores associados a toma única.

Desse modo, foi efetuado um teste t de *student*, comparando os valores obtidos para cada tempo de recolha, em contexto de toma única e contexto de toma repetida. A avaliação dos resultados permite concluir que as amostras apresentam diferenças estatisticamente significativas, já que, para todos os níveis estudados (T0, T24, T48 e T72), o valor obtido de P é sempre inferior a 0,05, sempre que se comparam os resultados de toma única com os resultados de toma repetida.

Relativamente ao grupo sacrificado 14 dias após o último consumo, os valores de GHB obtidos são da mesma ordem de grandeza e comparáveis com os valores obtidos no grupo de toma repetida. Os resultados obtidos nos tempos de recolha de 7 e 14 dias após o último consumo são apresentados na tabela 48.

Tabela 48 – Concentração de GHB obtida nas amostras de pêlo (em ng/mg) nos diversos tempos de recolha

Rato/ Tempo (h)	7 dias	14 dias
Rato 1	37,94	53,34
Rato 2	33,62	40,85
Rato 3	52,57	45,12
Rato 4	48,27	23,20
Rato 5	31,06	29,44
Média ± epm	40,69 ± 4,18	38,39 ± 5,41

Conclui-se que a concentração de GHB em pêlo pode ser um indicador útil para a distinção entre consumidor usual e não consumidor, independentemente do intervalo de tempo entre o consumo e a recolha de amostra.

3.3.3. RAZÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GHB EM AMOSTRAS DE PÊLO E SANGUE

Os resultados obtidos nas amostras colhidas no momento do sacrifício (T0) e 24, 48 e 72 horas *postmortem*, estão descritos na tabela 49.

Tabela 49 – Razões das concentrações de GHB obtidas nas amostras de pêlo (em ng/mg) e de sangue (mg/L) nos diversos tempos de recolha

	T0	T24	T48	T72
Razão sangue/pêlo	0,589 ± 0,276	0,621 ± 0,088	2,951 ± 0,788	2,858 ± 0,885
Razão pêlo/sangue	3,213 ± 1,013	1,678 ± 0,246	0,526 ± 0,205	0,814 ± 0,531

O valor das duas razões pode ser observado graficamente nas figuras 19 e 20.

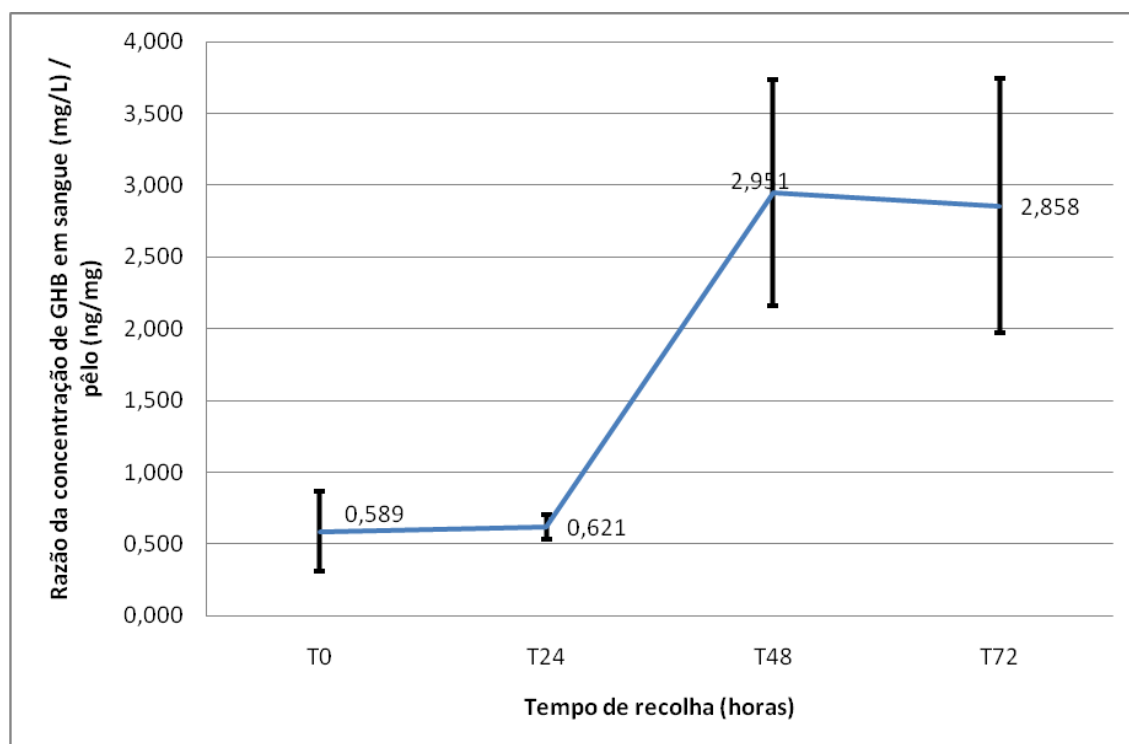


Figura 19 – Razão da concentração de GHB no sangue (mg/L) e em pêlo (ng/mg) nos diversos tempos de recolha. Dados em média ± epm (n=5 por tempo).

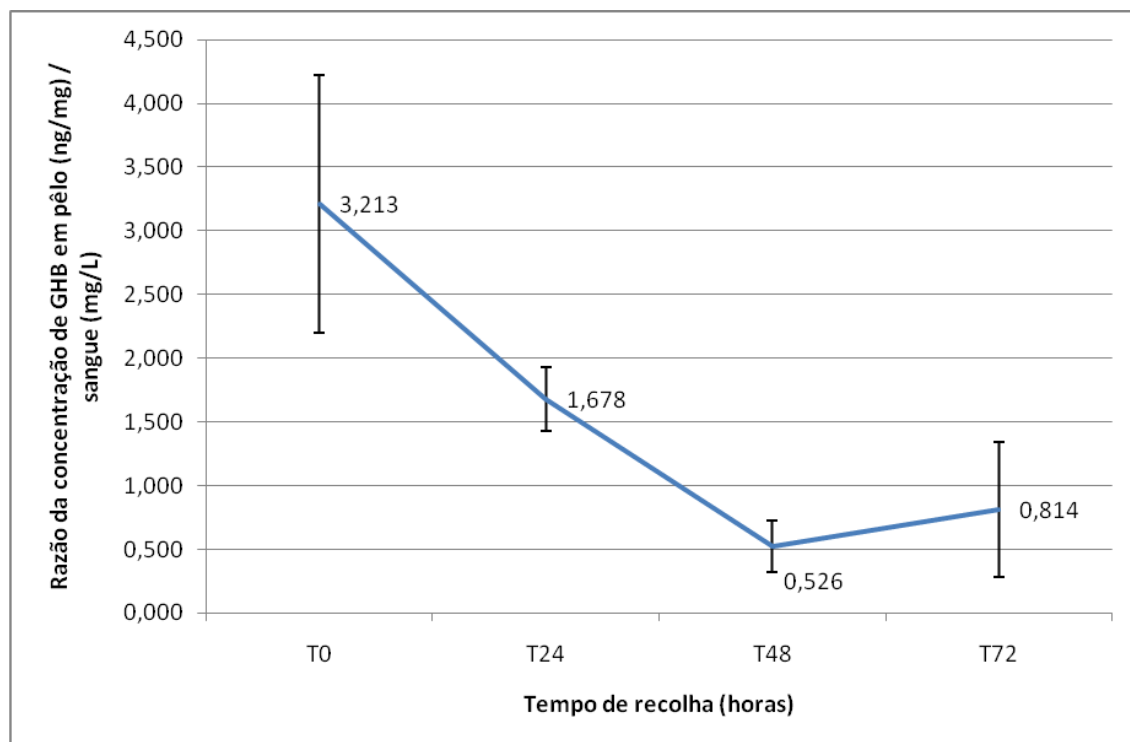


Figura 20 – Razão da concentração de GHB no pêlo (ng/mg) e sangue (mg/L), nos diversos tempos de recolha. Dados em média ± epm (n=5 por tempo).

Mais uma vez, a utilização das *razões* poderá permitir uma interpretação mais fácil do intervalo *postmortem*. Com efeito, o sentido decrescente da *razão* sangue/pêlo ao longo do tempo poderá ser indicativo de um PMI superior a 24 horas. Em paralelo, a utilização da *razão* pêlo/sangue conduz a conclusões semelhantes, se bem que com declive contrário.

Neste caso, no entanto, não foi possível uma distinção inequívoca entre os casos com 48 horas e 72 horas de intervalo *postmortem*.

Quanto ao grupo de ratos sacrificados 14 dias após o último consumo, as *razões* obtidas encontram-se expostas na tabela 50.

Tabela 50 – Razões da concentração de GHB em amostras de pêlo (em ng/mg) e de sangue (mg/L) nos diversos tempos de recolha

	7 dias	14 dias
Razão sangue/pêlo	0,003 ± 0,0005	0,002 ± 0,001
Razão pêlo/sangue	368,550 ± 39,866	537,978 ± 97,533

As razões obtidas são justificadas pela diminuição verificada nos valores de GHB no sangue, quer após 7 dias quer após 14 dias desde o último consumo.

4. COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES

Na literatura consultada apenas foi encontrado um estudo controlado de comportamento do GHB em contexto *postmortem* ao longo do tempo. Richard *et al.* (2005) avaliaram o comportamento do GHB em amostras *postmortem* de sangue e tecido cerebral de rato, ao longo do tempo, durante 5 dias, constatando que em ambas as amostras houve um aumento estatisticamente significativo da concentração de GHB. Esse aumento foi verificado em condições controladas de armazenamento dos cadáveres dos ratos testados, nomeadamente no que à temperatura de armazenamento diz respeito.

Nessa circunstância, foi verificado que a taxa de aumento da concentração foi superior na temperatura mais elevada de armazenamento, o que comprova os resultados obtidos e descritos em diversos estudos publicados, os quais sugerem, unanimemente, a temperatura de armazenamento como um fator fundamental na manutenção de níveis de GHB representativos do momento da morte. Assim, foi verificado um aumento de 5 µg/g até 40 µg/g de GHB nas primeiras 100 horas *postmortem* nos animais preservados a 20°C e um aumento de 5 µg/g até 25 µg/g de GHB nas primeiras 100 horas *postmortem* nos animais preservados a 15°C.

Os resultados obtidos na realização deste protocolo sugerem que o GHB apresenta um padrão de comportamento que poderá ser útil para a definição do PMI, bem como para uma distinção entre valores associados a consumo exógeno e a contexto endógeno.

Em termos de perfil farmacocinético, é notório que ao final de 6 horas os valores encontrados já estão muito próximos dos valores de contexto endógeno, comprovando a necessidade de intervenção rápida na recolha de amostra em contexto de consumo exógeno, nomeadamente para efeitos de abuso sexual facilitado por substância.

No perfil de toma única, as amostras de sangue obtidas duas horas após a administração apresentaram valores coerentes com o estudo farmacocinético realizado previamente, pelo que o aumento da concentração verificado nos tempos de recolha seguintes, até às 72 horas, será resultado de metabolização *postmortem*. Esta metabolização apresentou uma tendência de comportamento, com a subida dos valores médios até às 72 horas, sugerindo que a previsão do PMI para um determinado contexto *postmortem* possa ter um apoio fundamentado na concentração de GHB. Relativamente às amostras de pêlo, os valores encontrados são semelhantes aos valores associados a contexto endógeno. Tal deve-se, certamente, ao curto espaço de tempo passado entre a toma do composto e o sacrifício dos animais, tempo este insuficiente para a deposição do composto no pêlo.

As *razões* pêlo/sangue e sangue/pêlo são claramente influenciadas pelo comportamento da concentração de GHB no sangue à medida que o PMI aumenta, algo esperado perante a obtenção de valores semelhantes para as amostras de pêlo ao longo do intervalo de tempo estudado.

Os resultados obtidos nas amostras de pêlo e de sangue associadas a consumo repetido podem ser avaliados em dois momentos. Após 14 dias de eliminação do GHB exógeno os valores no sangue atingem níveis equiparados a origem endógena. Em contrapartida, os valores encontrados no pêlo são equiparados aos valores encontrados no pêlo dos ratos sacrificados logo após o último consumo. Paralelamente, as *razões* de sangue/pêlo e de pêlo/sangue são também indicativas de um consumo, sendo inferiores e superiores, respectivamente, às *razões* obtidas para os casos associados a consumo único, ou sem consumo. Assim, para efeitos de distinção entre origem exógena e endógena, a análise e determinação de GHB no pêlo é fundamental, já que os valores encontrados parecem permitir uma distinção entre consumo crônico e ausência de consumo ou consumo único.

Como em qualquer estudo experimental, a extrapolação dos resultados obtidos para o Homem carece de fundamentação mais abrangente. Contudo, a realização deste protocolo em animal permitiu elaborar alguns raciocínios que ajudam a interpretar circunstâncias que podem ocorrer no âmbito da toxicologia forense, e que merecerão mais investigação.

Capítulo V – Conclusões

O trabalho apresentado permitiu desenvolver uma metodologia analítica para determinação de GHB em amostras de sangue total, urina e cabelo através de GC-MS/MS. As amostras foram preparadas por precipitação metanólica (no caso das amostras de sangue total e urina) e extração líquido-líquido (no caso das amostras de cabelo).

A validação analítica das metodologias descritas permitiu a aplicação das mesmas a um conjunto de amostras reais de sangue e cabelo, bem como à análise de um conjunto de amostras de sangue e pêlo de ratos, provenientes de estudos experimentais que pretenderam mimetizar contextos de toma única e de toma repetida.

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) Os métodos desenvolvidos e validados apresentam sensibilidade e limites de deteção e quantificação melhorados, quando comparados com os métodos mais comuns que se encontram descritos na literatura, nomeadamente o GC-MS-single quadrupole;
- b) A aplicação das metodologias a casos reais *postmortem* sugere que a concentração de GHB no sangue *postmortem* poderá vir a ser utilizada para a estimativa do intervalo *postmortem* de um indivíduo;
- c) A avaliação das amostras de cabelo dos casos estudados permite sugerir o uso desta amostra biológica para uma eventual distinção entre contexto endógeno e exógeno, o mesmo se aplicando à razão entre os valores encontrados em sangue total e em cabelo;
- d) A aplicação das metodologias analíticas desenvolvidas às amostras do estudo animal permite concluir que o comportamento farmacocinético de uma toma única apresenta um pico máximo duas horas após a toma, atingindo valores de carácter endógeno 6 horas após a mesma;
- e) O comportamento *postmortem* das amostras de sangue no rato é indicativo de uma separação do PMI entre as 24 e as 48 horas, que poderá ser útil na

estimativa do PMI, tanto em contexto de toma única (consumidor pontual) como de toma crónica (consumidor usual);

- f) Em contrapartida, as amostras de pêlo não parecem ser influenciadas pelo PMI, mas poderão ser relevantes para a distinção entre valores de contexto endógeno versus exógeno.
- g) Coletivamente, o estudo animal corrobora a indicação das determinações em casos reais de que as amostras de sangue poderão ser úteis para a estimativa do PMI, enquanto as amostras de cabelo poderão ser importantes para distinguir níveis endógenos de exógenos, resultantes do consumo.

Como conclusão final, este trabalho permitiu o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de GHB em amostras biológicas (sangue, urina e cabelo), passível de ser aplicada na rotina pericial médico-legal em toxicologia forense. Adicionalmente, este estudo forneceu dados que podem ser relevantes para uma distinção fundamentada entre valores de GHB endógenos e de origem exógena, bem como para uma potencial utilização deste composto como biomarcador de determinação do intervalo *postmortem*, o que se reveste de grande importância no contexto forense.

Parte IV – Referências Bibliográficas

A

Abraham TT, Lowe RH, Pirnay SO, Darwin WD, Huestis MA; Simultaneous GC-EI-MS determination of Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta 9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in human urine following tandem enzyme-alkaline hydrolysis. *Journal of Analytical Toxicology*; 2007; **31**(8):477-85.

Al-Samarraie M.S., Karinen R., Mørland J., Opdal M.S.; Blood GHB concentrations and results of medical examination in 25 car drivers in Norway; *European Journal of Clinical Pharmacology*; 2010; **66** 987-998.

Anderson I.B., Kim S.Y., Dyer J.E., Burkhardt C.B., Iknoian J.C., Walsh M.C., Blanc P.D.; Trends in γ -Hydroxybutyrate (GHB) and Related Drug Intoxication: 1999 to 2003; *Annals of Emergency Medicine*; 2006; **47** 177-183.

Andresen H., Sprys N., Schmoldt A., Mueller A., Iwersen-Bergmann S.; Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations; *Forensic Science International*; 2010; **200** 93-99.

Andresen-Streichert H., Jensen P., Kietzerow J., Schrot M., Wilke N., Vettorazzi E., Mueller A., Iwersen-Bergmann S.; Endogenous gammahydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post-mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. *International Journal of Legal Medicine*; 2015; **129** 57-68.

Aromatario M., Bottoni E., Santoni M., Ciallella C.; New “lethal highs”: a case of a deadly cocktail of GHB and mephedrone; *Forensic Science International*; 2012; **223** e38-e41.

B

Beránková K., Mutňanská K., Balíková M.; Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine; *Forensic Science International*; 2006; **161** 158-162.

Bertol E., Argo A., Procaccianti P., Vaiano F., Di Milia M.G., Furlanetto S., Mari F.; Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 2012; **70** 518-522.

Bertol E., Mari F., Vaiano F., Romanob G., Zaami S, Bagliod G., Busardò F.P.; Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases; *Drug Testing and Analysis*; 2015; **7**(5) 376–384.

Brenneisen R., Elsohly M.A., Murphy T.P., Passarelli J., Russmann S., salamone S.J., Watson D.E.; Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects; *Journal of Analytical Toxicology*; 2004; **28** 625-630.

Britt G.C., McCance-Katz E.F.; A Brief Overview of the Clinical Pharmacology of “Club Drugs”; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1189-1201.

Busardo F.C., Bertol E., Vaiano F., Baglio G., Montana A., Barbera N., Zaami S., Romano G.; Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples; *Forensic Science International*; 2014; **243** 144-148.

C

Castro A.L.; Quantificação de Club Drugs em Amostras Biológicas em Toxicologia Forense (Tese de Mestrado); *Universidade de Aveiro*; 2008.

Chen M., Andrenyak D.M., Moody D.E., Foltz R.L.; Stability of plasma gamma-hydroxybutyrate determined by gas chromatography-positive ion chemical ionization-mass spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 2003; **27** 445-448.

Cook C.D., Biddlestone L., Coop A., Beardsley P.M.; Effects of Combining Ethanol (EtOH) with gamma-hydroxybutyrate (GHB) on the Discriminative Stimulus, Locomotor, and Motor-impairing Functions of GHB in Mice; *Psychopharmacology*; 2006; **185** 112-122.

Couper F.J., Marinetti L.J.; γ -Hydroxybutyrate (GHB) – Effects on Human Performance and Behavior; *Forensic Science Review*; 2002; **14** 101-121.

Crookes C.E., Faulds M.C., Forrest A.R.W., Galloway J.H.; A reference range for endogenous Gamma-hydroxybutyrate in urine by gas chromatography-mass spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 2004; **28** 644-649.

Crunelli V., Emri Z., Leresche N.; Unravelling the Brain Targets of γ -Hydroxybutyric Acid; *Current Opinion in Pharmacology*; 2006; **6** 44-52.

D

Dahl S.R., Olsen K.M., Strand D.H.; Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS; *Journal of Chromatography B*; 2012; **885-886**, 37-42.

Dimitrijevic N., Dzitoyeva S., Satta R., Imbesi M., Yildiz S., Manev H.; Drosophila GABA_B Receptors Are Involved in Behavioral Effects of γ -Hydroxybutyric Acid (GHB); *European Journal of Pharmacology*; 2005; **519** 246-252.

Dresen S., Kempf J., Weinmann W.; Prevalence of γ -hydroxybutyrate (GHB) in serum samples of amphetamine, metamphetamine and ecstasy impaired drivers; *Forensic Science International*; 2007; **173** 112-116.

E

Elian A.A.; A Novel Method for GHB Detection in Urine and Its Application in Drug-Facilitated Sexual Assaults; *Forensic Science International*; 2000; **109** 183-187.

Elian A.A.; GC-MS Determination of Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB) in Blood; *Forensic Science International*; 2001; **122** 43-47.

Elian A.A.; Determination of Endogenous Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB) Levels in Antemortem Urine and Blood; *Forensic Science International*; 2002; **128** 120-122.

Elian A.A., Hackett J.; Anion Exchange SPE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in GHB analysis; *Journal of Chromatography B*; 2011; **879** 3752-3758.

Elliott S.; Gamma Hydroxybutiric Acid (GHB) Concentrations in Humans and Factors Affecting Endogenous Production; *Forensic Science International*; 2003; **133** 9-16.

Elliott S.P.; Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid: implications for the interpretation of findings; *Journal of Analytical Toxicology*; 2004; **28** 20-26.

Elliott S., Lowe P., Symonds A.; The Possible Influence of Micro-organisms and Putrefaction in the production of GHB in Post-Mortem Biological Fluid; *Forensic Science International*; 2004; **139** 183-190.

EMCDDA; GHB and its precursor GBL: an emerging trend case study; *EMCDDA Thematic papers*; 2008. EMCDDA; Seizures of Drugs Summary; www.emcdda.europa.eu/data/2014#displayTable:SZR-23-0 (consultado em 30/05/2014).

F

Fjeld B., Burns M.L., Karinen R., Larssen B., Smith-Kielland A., Vindenes V.; Long-term stability of GHB in post-mortem samples and samples from living persons, stored at -20°C, using fluoride preservatives; *Forensic Science International*; 2012; **222** 47-51.

Freese T.E., Miotto K., Reback C.J.; The Effects and Consequences of Selected Club Drugs; *Journal of Substance Abuse treatment*; 2002; **23** 151-156.

Frucht S.J., Bordelon Y., Houghton W.H., Reardan D.; A Pilot Tolerability and Efficacy Trial of Sodium Oxybate in Ethanol-Responsive Movement Disorders; *Movement Disorders*; 2005; **20** 1330-1337.

Fukui Y., Matsusima E., Muramoto K., Nagai N., Ohama K., Yamashita K.; Validation of a Simple Gas Chromatographic – Mass Spectrometric Method for the Determination of Gamma-Butyrolactone in Human Plasma; *Journal of Chromatography B*; 2003; **785** 73-80.

G

Gahlinger P.M.; Club Drugs: MDMA, Gamma-Hydroxybutirate (GHB), Rohypnol, and Ketamine in American Family Physician; 2004; **69(11)** 2619-2626.

Gilbert Calabuig JA. Intoxicaciones por plaguicidas. In: *Medicina Legal y Toxicología*. Calabuig JA, Villanueva CE, 5.^a ed. Barcelona: Masson; SA; **1998**. p. 679-690/806-16.

Grenier V., Huppé G., Lamarche M., Mireault P.; Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices; *Journal of Analytical Toxicology*; 2012; **36** 523-528.

Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Levine B, Huestis MA. Validated method for the simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocanna-binol (THC), 11-hydroxy-THC-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization. *Journal of Chromatography B*; 2003; **798**: 145-54.

Guyton AC. Fisiologia Humana e Mecanismo das Doenças. 5.^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 1991; 175-187 e 210-20.

H

Hechler V., Gobaille S., Bourguignon J., Maitre M.; Extracellular events induced by gamma-hydroxybutyrate in striatum: a microdialysis study; *Journal of neurochemistry*; 1991; **56** 938-944.

Hennessy S.A., Moane S.M., McDermott S.D.; The Reactivity of Gamma – Hydroxybutyric Acid (GHB) and Gamma – Butyrolactone (GBL) in Alcoholic Solutions; *Journal of Forensic Science*; 2004; **49** 1-10.

Hopfer C., Mendelson B., Van Leeuwen J.M. Kelly S., Hooks S.; Club Drug Use Among Youths in Treatment for Substance Abuse; *The American Journal of Addictions*; 2006; **15** 94-99.

Huestis MA, Cone EJ; Alternative testing matrices. *In: Drug Abuse Handbook*. Karch SB ed, CRC Press, Boca Raton. **1998**, 799-857.

Huestis MA, Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Bourland JA, Sweeney SA, Hayes EF, Carpenter PM, Smith ML; Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users; *Forensic Science International*; 2007; **169**:129-136.

J

Johansen S.S., Windberg C.N.; Simultaneous determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) and its analogues (GBL, 1,4-BD, GVL) in whole blood and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 2011; **35** 8-14.

Jagerdeo E., Montgomery M.A., LeBeau M.A.; An Improved Method for the Analysis of GHB in Human Hair by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 2015; **39** 83–88.

K

Kalasinsky K.S., Dixon M.M., Schmunk G.A., Kish S.J.; Blood, brain, and hair GHB concentrations following fatal ingestion; *Journal of Forensic Sciences*; 2001; **46(3)** 728-730.

Kavanagh P.V., Kemmy P., Feely J.; The urinary excretion of γ -hydroxybutyric acid in man; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 2001; **53** 399-402.

Kerrigan S.; In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples; *Journal of Analytical Toxicology*; 2002; **26** 571-574.

Kintz P., Cirimele V., Jamey C., Ludes B.; Testing for GHB in Hair by GC/MS/MS after a Single Exposure. Application to Document Sexual Assault; *Journal of Forensic Sciences*; 2003; **48(1)** 1-6.

Kintz, P., Value of hair analysis in postmortem toxicology; *Forensic Science International*; 2004; **142** 127–134

Kintz P., Villain M., Cirimele V., Ludes B.; GHB in postmortem toxicology discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens; *Forensic Science International*; 2004; **143** 177-181.

Kintz P.; Value of the concept of minimal detectable dosage in human hair; *Forensic Science International*; 2011; **218**(1-3) 28-30.

Knapp D.R.; Handbook of Analytical Derivatization Reactions; Wiley Interscience Publication; Nova Iorque; **1979**.

Korb A.S., Cooper G.; Endogenous concentrations of GHB in postmortem blood from deaths unrelated to GHB use; *Journal of Analytical Toxicology*; 2014; **38** 582-588.

Kugelberg F.C., Holmgren A., Eklund A., Jones A.W.; Forensic toxicology findings in deaths involving gamma-hydroxybutyrate; *International Journal of Legal Medicine*; 2010; **124** 1-6.

L

LeBeau M.A., Miller M.L., Levine B.; Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine; *Forensic Science International*; 2001; **119** 161-167.

LeBeau MA, Montgomery MA, Morris-Kukoski C, Schaff JE, Deakin A.; Further Evidence of *In Vitro* Production of Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in Urine Samples; *Forensic Science International* 2007; **169**:152-156.

Lott S., Musshoff F., Madea B.; Estimation of gamma-hydroxybutyrate (GHB) co-consumption in serum samples of drivers positive for amphetamine and ecstasy; *Forensic Science International*; 2012; **221** 98-101.

M

Mari F., Politi L., Trignano C., Di Milia M.G., Di Padua M., Bertol E.; What constitutes a normal ante-mortem urine GHB concentration?; *Journal of Forensic and Legal Medicine*; 2009; **16** 148-151.

Marinetti L.J., Isenschmid D.S., Hepler B.R., Kanlun S.; Analysis of GHB and 4-Methyl-GHB in Postmortem Matrices after Long-Term Storage; *Journal of Analytical Toxicology*; 2005; **29** 41-47.

Maxwell J.C.; Party Drugs: Properties, Prevalence, Patterns and Problems; *Substance Use and Misuse*; 2005; **40** 1203-1240.

Mazarr-Proo S., Kerrigan S.; Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose; *Journal of Analytical Toxicology*; 2005; **29** 398-400.

McCusker R.R., Paget-Wilkes H., Chronister C.W., Goldberger B.A.; Analysis of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Urine by Gas-Chromatography-Mass Spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*; 1999; **23**(5) 301-305.

Melo P., Machado R., Teixeira H.M.; Analysis of Digoxin and Metildigoxin in Whole Blood Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry; *International Journal of Analytical Chemistry*; 2012; doi:10.1155/2012/975824.

Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T. Determination of drugs of abuse in blood. *J Chrom B*; 1998; **713**: 91-109.

Moriya F., Hashimoto Y.; Endogenous γ -hydroxybutyric Acid Levels in Postmortem Blood; *Legal Medicine*; 2004; **6** 47-51.

Moriya F., Hashimoto Y.; Site-Dependent Production of γ -hydroxybutyric Acid in the Early Postmortem Period; *Forensic Science International*; 2005; **148** 139-142.

Moriya F., Nishimura H., Furumiya J., Hashimoto Y.; Effects of drinking and smoking on endogenous levels of urinary γ -hydroxybutyric acid, a preliminary study; *Legal Medicine*; 2006; **8** 231-234.

N

Negrusz A., Gaensslen R.E.; Analytical Developments in Toxicological Investigation of Drug-facilitated Sexual Assault; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 2003; **376** 1192-1197.

Nicholson K.L., Balster R.L.; GHB: A New and Novel Drug of Abuse; *Drug and Alcohol Dependence*; 2001; **63** 1-22.

P

Paul R., Tsanaclis L., Kingston R., Berry A., Guwy A.; GC-MS-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in blood and urine; *Journal of Analytical Toxicology*; 2006; **30** 375-379.

Paul R., Tsanaclis L., Kingston R., Berry A., Guwy A.; Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS; *Drug Testing and Analysis*; 2011; **3** 201-205.

Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. *Accreditation and Quality Assurance*; 2002; **7**: 441-9.

Peters F.T., Drummer O.H., Musshoff F.; Validation of new methods; *Forensic Science International*; 2007; **165** 216–224

Pocinho M., Estatística - Volume I, *Instituto Superior Miguel Torga*; 2009

Polícia Judiciária, Combate ao tráfico de estupefacientes em Portugal – Estatística Anual - Relatório TCD, *Polícia Judiciária – Secção Central de Informação Criminal*; 2000 – 2013

Proença P., Teixeira H., Pinheiro J., Marques E.P., Vieira D.N.; Forensic Intoxication with Clobazam: HPLC/DAD/MSD Analysis; *Forensic Science International*; 2004; **143** 205-209.

R

Ricaurte G.A., McCann U.D.; Recognition and Management of Complications of New Recreational Drugs; *The Lancet*; 2005; **365** 2137-2145.

Richard D., Ling B., Authier N., Faict T.W., Eschalier A., Coudoré F.; GC/MS Profiling of γ -Hydroxybutyrate and Precursors in Various Animal Tissues Using Automatic Solid-Phase Extraction. Preliminary Investigations of Its Potential Interest in Postmortem Interval Determination; *Analytical Chemistry*; 2005; **77** 1354-1360.

Rodgers J., Ashton C.H., Gilvarry E., Young A.H.; Liquid Ecstasy: a new kid on the dance floor; *British Journal of Psychiatry*; 2004; **184** 104-106.

Rossi R., Lancia M., Gambelunghe C., Oliva A., Fucci N.; Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault; *Forensic Science International*; 2009; **186** e9-e11.

S

Sadones N., Archer J.R.H., Ingels A.M.E., Dargan P.I., Wood D.M., Wood M., Neels H., Lambert W.E., Stove C.P.; Do capillary dried blood spot concentrations of Gamma-hydroxybutyric acid mirror those in venous blood? A comparative study; *Drug Testing and Analysis*; 2015; **7**(4) 336-340.

Sassenbroeck D.K., Neve N., Paepe P., Belpaire F.M., Verstraete A.G., Calle P.A., Buylaert W.A.; Abrupt Awakening Phenomenon Associated with Gamma-Hydroxybutyrate Use: a Case Series; *Clinical Toxicology*; 2007; **45** 533-538.

Segura J., Ventura R., Jurado C.; Derivatization Procedures for Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Xenobiotics in Biological Samples, with Special Attention to Drugs of Abuse and Doping Agents; *Journal of Chromatography B*; 1998; **713** 61-90.

Shima N., Miki A., Kamata T., Katagi M., Tsuchihashi H.; Urinary Endogenous Concentrations of GHB and Its Isomers in Healthy Humans and Diabetics; *Forensic Science International*; 2005; **149** 171-179.

Shima N., Miki A., Kamata T., Katagi M., Tsuchihashi H.; Endogenous level and *in vitro* production of GHB in blood from healthy humans, and the interpretation of GHB levels detected in antemortem blood samples; *Journal of Health Sciences*; 2005; **51**(2) 147-154.

Skopp G.; Preanalytic Aspects in Postmortem Toxicology; *Forensic Science International*; 2004; **142** 75-100.

Smith K.M., Larive L.L., Romanelli F.; Club Drugs: methylenedioxymethamphetamine, Flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and γ -hydroxybutyrate; *American Journal of Health-System Pharmacists*; 2002; **59** 1067-1076.

Sørensen L.K., Hasselstrøm J.B.; A hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of γ -hydroxybutyrate and its precursors in forensic whole blood; *Forensic Science International*; 2012; **222** 352-359.

Soriano T., Jurado C., Menéndez M., Repetto M.; Improved Solid-Phase Extraction Method for Systematic Toxicological Analysis in Biological Fluids; *Journal of Analytical Toxicology*; 2001; **25** 137-143.

Stimpfl T., Vycudilik W.; Automatic Screening in Postmortem Toxicology; *Forensic Science International*; 2004; **142** 115-125.

Franke J.P., de Zeeuw R.A.; Solid-Phase Extraction in Systematic Toxicological Analysis; *Journal of Chromatography B*; 1998; **713** 51-59.

Stout P.A., Simons K.D., Kerrigan S.; Quantitative analysis of gamma-hydroxybutyrate at endogenous concentrations in hair using liquid chromatography tandem mass spectrometry; *Journal of Forensic Sciences*; 2010; **55**(2) 531-537.

Struys E.A., *et al*; Metabolism of γ -hydroxybutyrate to D-2-hydroxyglutarate in Mammals: Further Evidence for D-2-Hydroxyglutarate Transhydrogenase; *Metabolism Clinical and Experimental*; 2006; **55** 353-358.

T

Tarelho S.; Implementação de Técnicas Analíticas de Determinação de Benzodiazepinas Aplicadas à Toxicologia Forense; *Departamento de Química da Universidade de Aveiro*; Aveiro; 2003.

Tateo F., Bononi M.; Determination of Gamma-butyrolactone (GBL) in Foods by SBSE-TD/GC/MS; *Journal of Food Composition and Analysis*; 2003; **16** 721-727.

U

Uys J.D.K., Niesink R.J.M.; Pharmacological Aspects of the Combined Use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and Gamma-hydroxybutyric Acid (GHB): a Review of the Literature; *Drug and Alcohol Review*; 2005; **24** 359-368.

V

Villain M., Cirimelen V., Ludes B., Kintz P.; Ultra-rapid procedure to test for γ -hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography–mass spectrometry; *Journal of Chromatography B*; 2003; **792** 83-87.

W

Weir, W; Raves: a review of the culture, the drugs and the prevention of harm; *Canadian Medical Association Journal*; 2000; **162(13)** 1843-1848.

Wood M., Laloup M., Samyn N., Morris M.R., de Bruijn E.A., Maes R.A., Young M.S., Maes V., de Boeck G.; Simultaneous Analysis of Gamma-Hydroxybutyric Acid and its Precursors in Urine using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; *Journal of Chromatography A*; 2004; **1056** 83-90.

Z

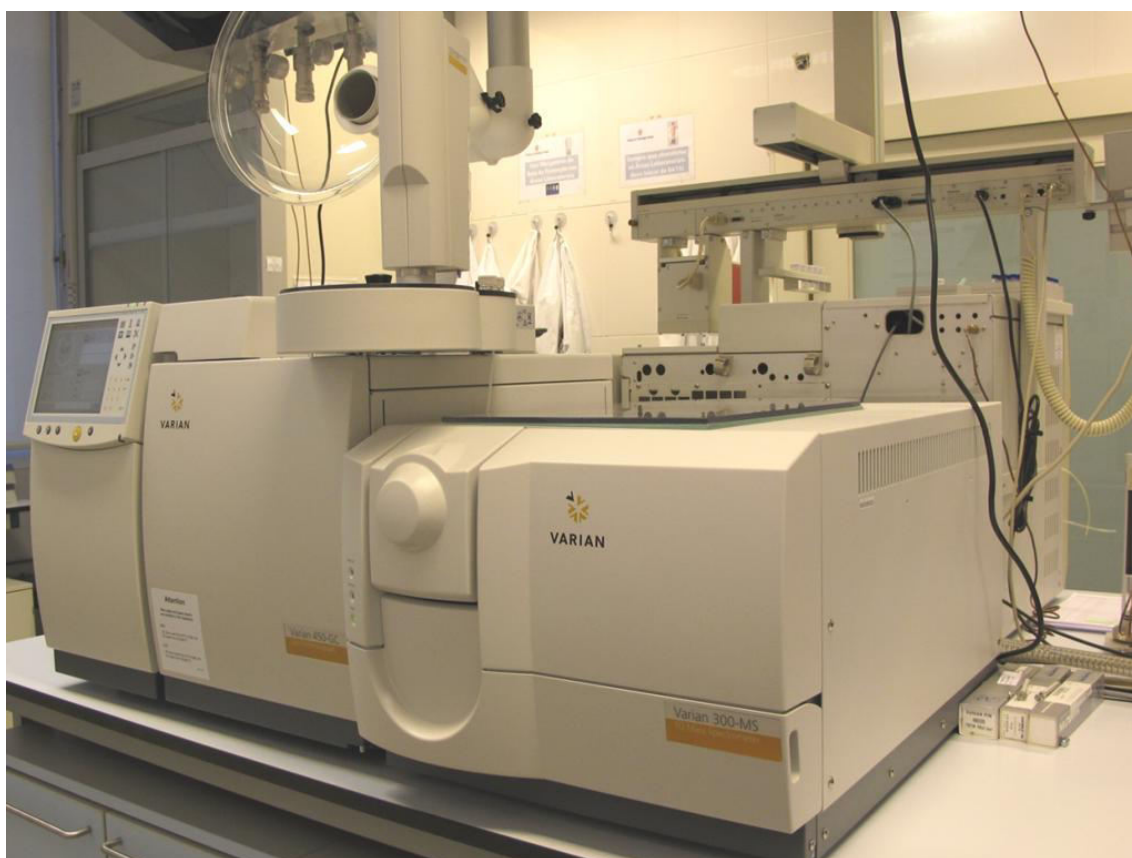
Zörntlein S.W., Kopp A., Becker J., Kaufmann T.J., Röhrich J, Urban R.; In vitro production of GHB in blood and serum samples under various storage conditions; *Forensic Science International*; 2012; **214** 113-117.

Zvosec D.L., Smith S.W.; Agitation is Common in γ -Hydroxybutyrate Toxicity; *The American Journal of Emergency Medicine*; 2005; **23** 316-320.

ANEXOS

Anexo 1

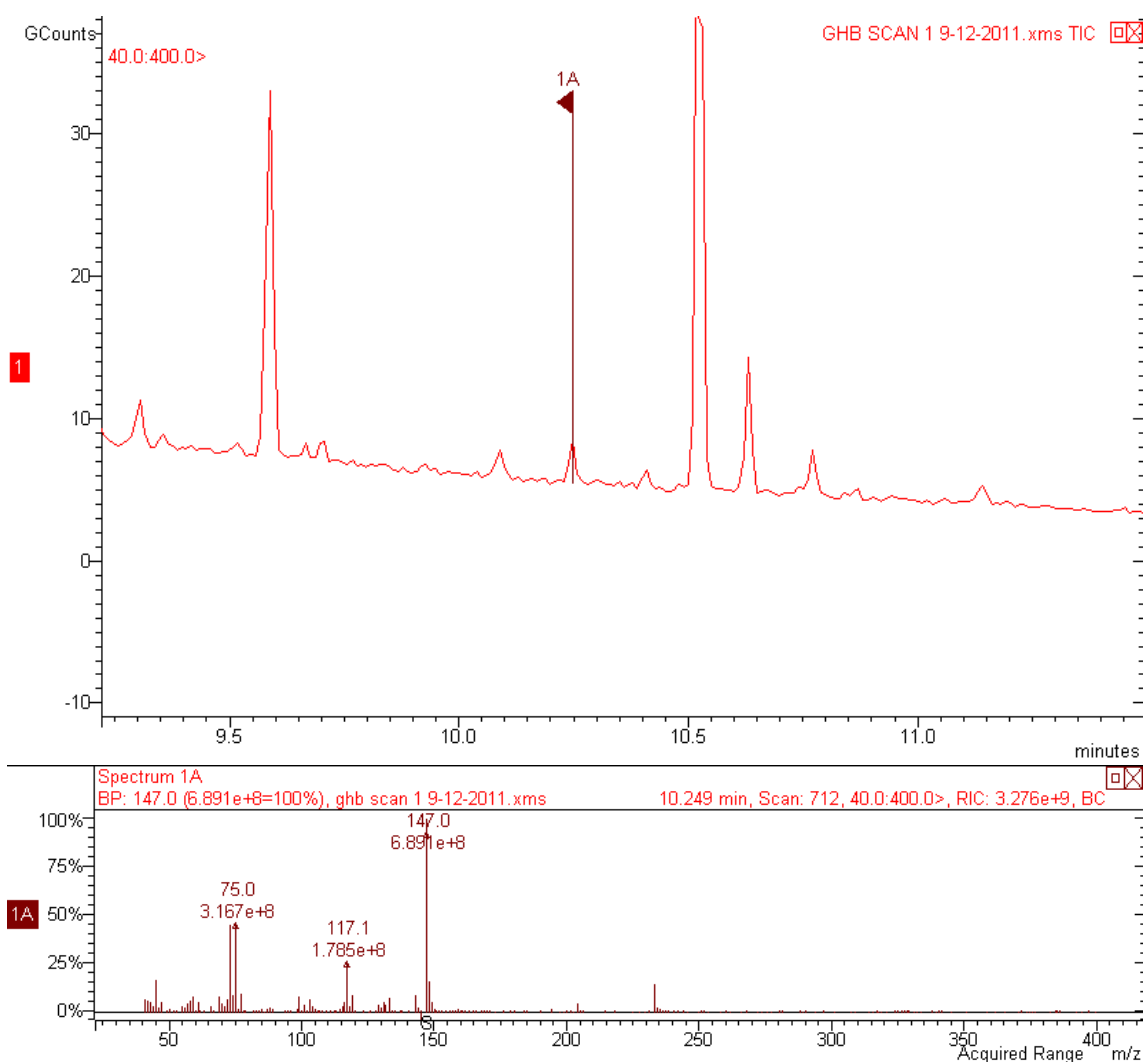
Equipamento analítico utilizado (BRUKER)



Equipamento instrumental utilizado na determinação analítica de GHB – cromatógrafo gasoso Bruker GC-450 e espectrômetro de massas Bruker MS-300

Anexo 2

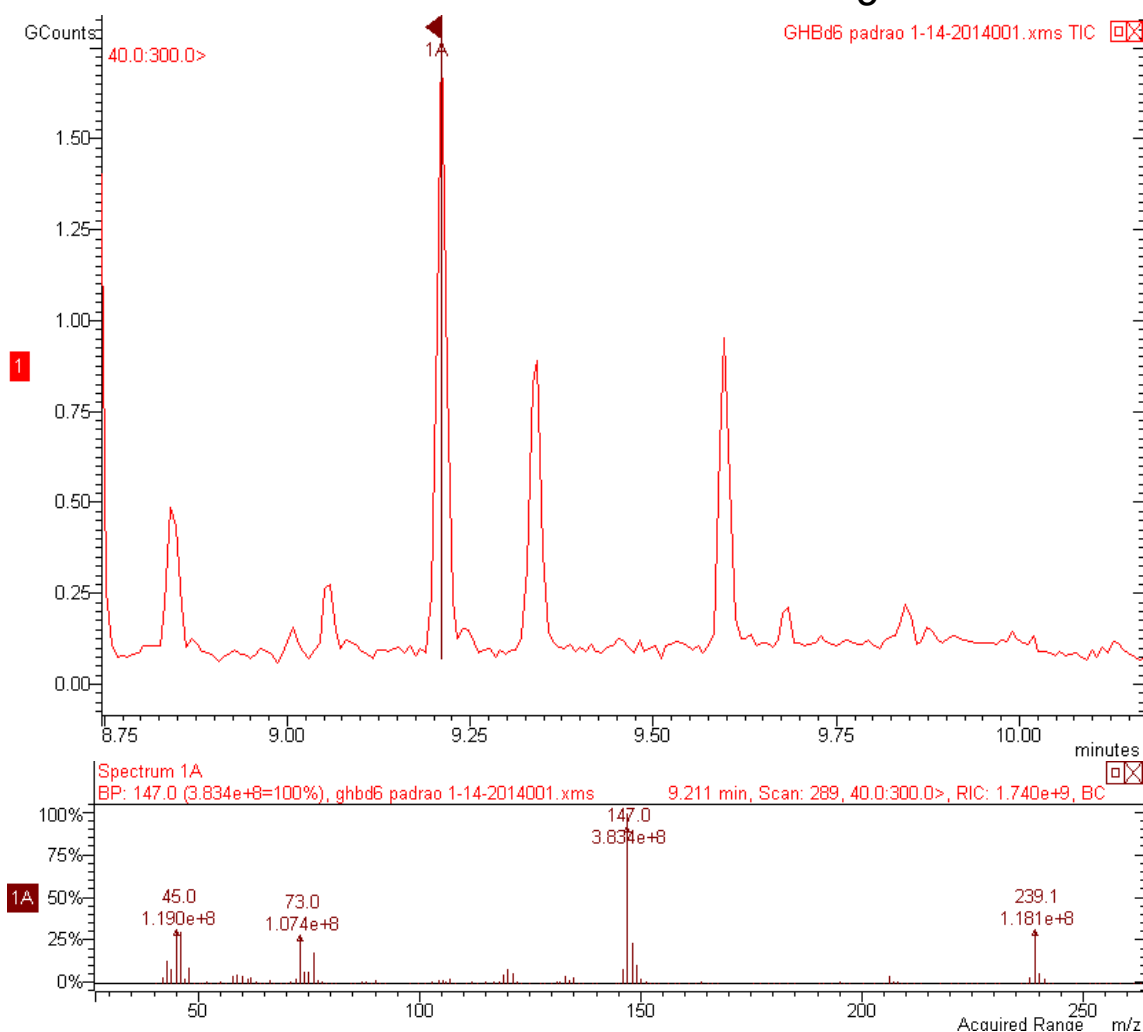
Cromatograma e Espectro de massa em SCAN de GHB



Cromatograma referente a análise de padrão de GHB, em modo SCAN, com sinal analítico identificado e respectivo espectro de massa, com identificação dos fragmentos mais intensos.

Anexo 3

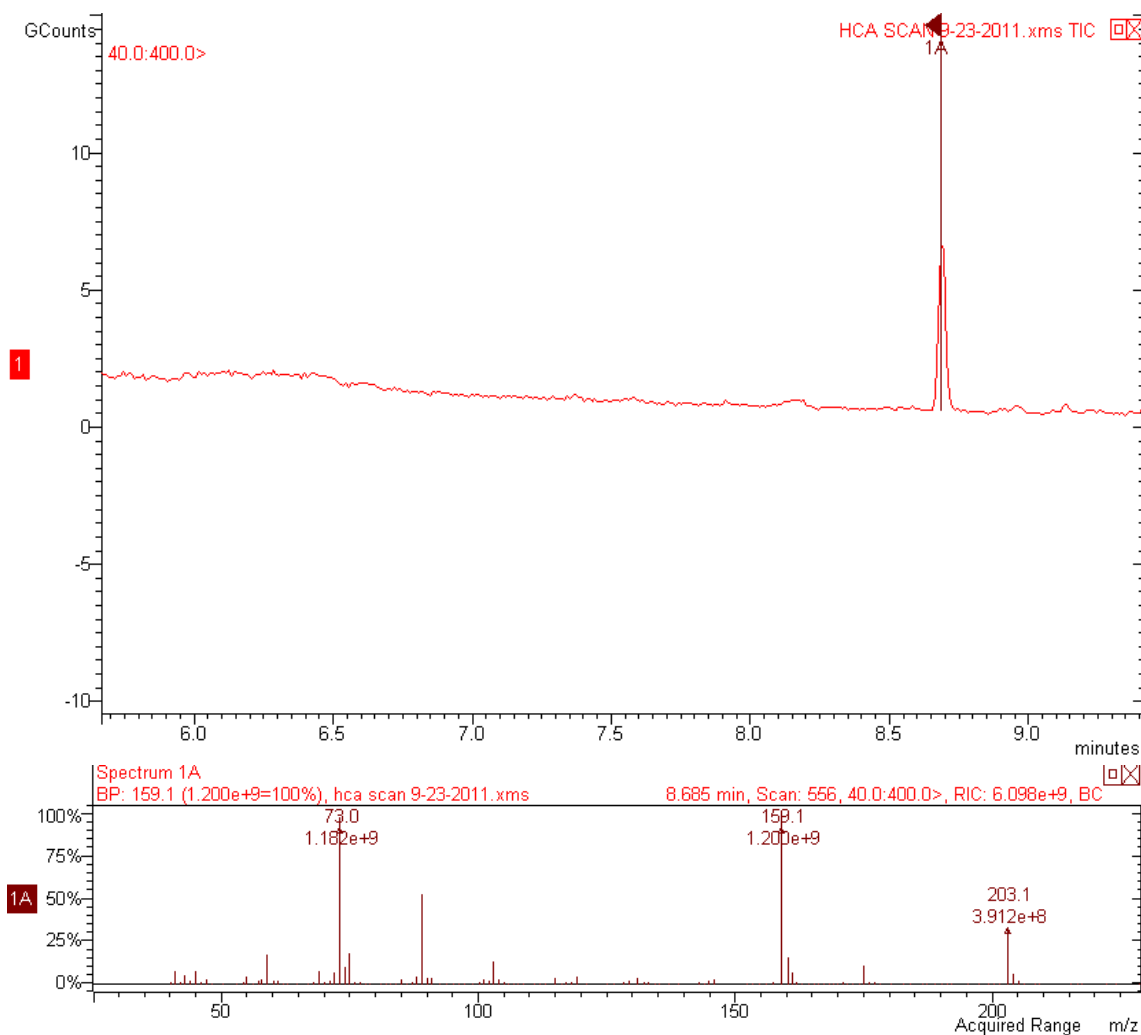
Cromatograma e Espectro de massa em SCAN de GHB-D₆



Cromatograma referente a análise de padrão de GHB-D₆, em modo SCAN, com sinal analítico identificado e respectivo espectro de massa, com identificação dos fragmentos mais intensos.

Anexo 4

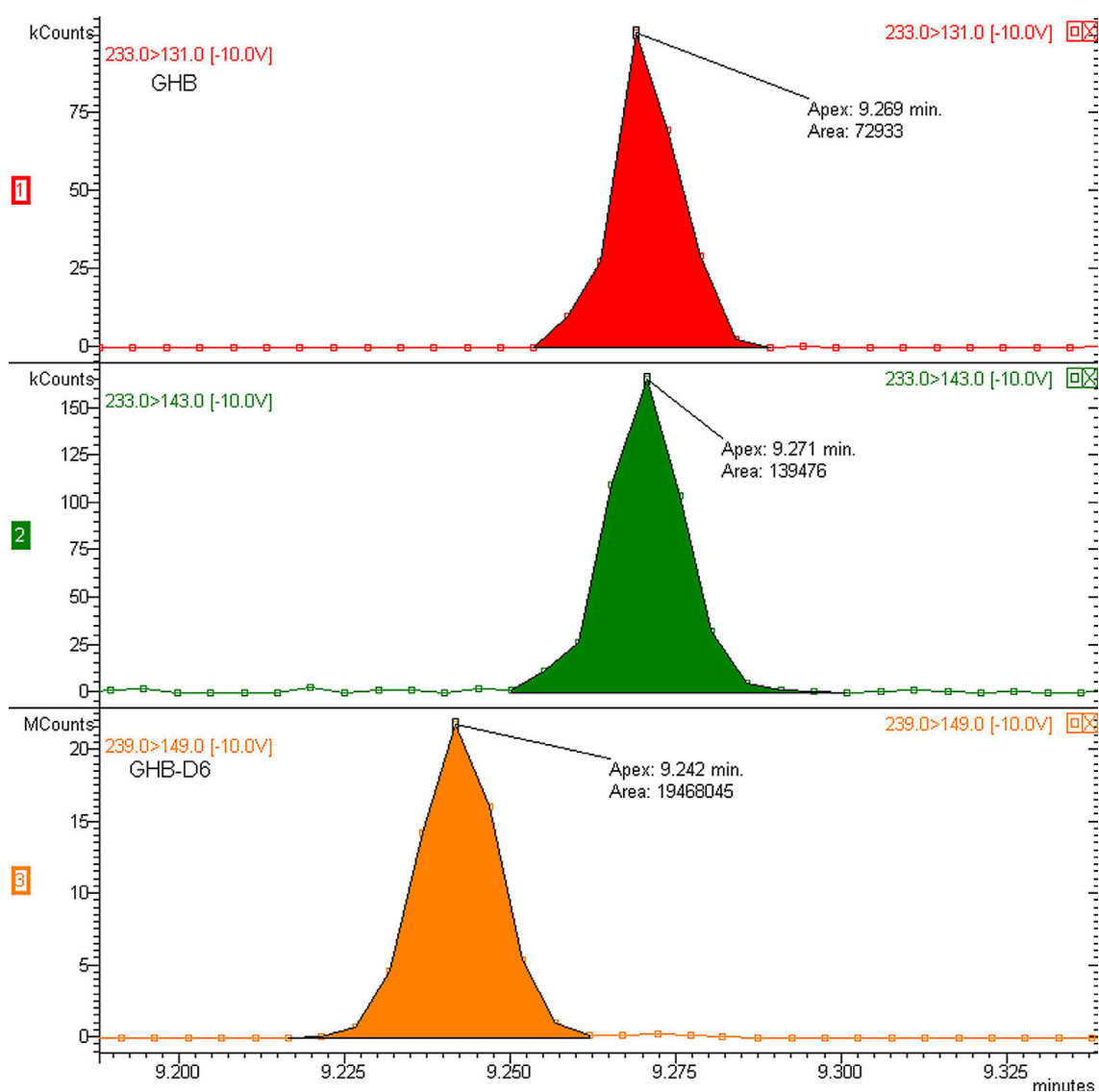
Cromatograma e Espectro de massa em SCAN de HCA



Cromatograma referente a análise de padrão de HCA, em modo SCAN, com sinal analítico identificado e respectivo espectro de massa, com identificação dos fragmentos mais intensos.

Anexo 5

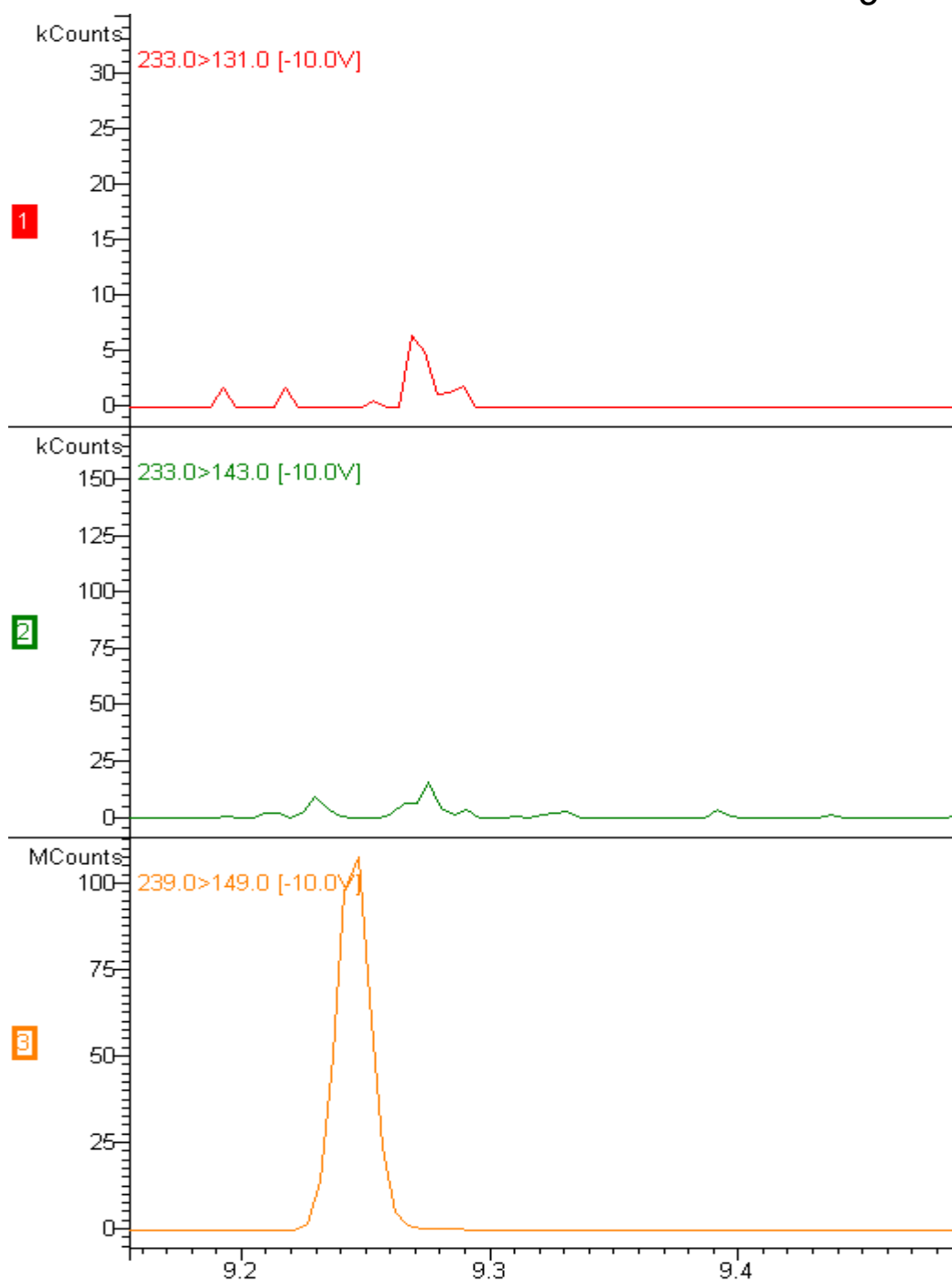
Cromatograma em SIM/SIM de GHB [0,1 mg/L] e GHB-D₆ [1 mg/L]



Cromatograma referente a análise de amostra fortificada de GHB e GHB-D₆, em modo SIM/SIM, com sinais analíticos correspondentes às transições-diagnóstico para o GHB (233>131 m/z e 233>143 m/z) e para o GHB-D₆ (239>149 m/z).

Anexo 6

Cromatograma em SIM/SIM de amostra branca com GHB-D₆



Cromatograma referente a análise de amostra branca, em modo SIM/SIM, com sinais analíticos correspondentes às transições-diagnóstico para o GHB (233>131 m/z e 233>143 m/z) e para o GHB-D₆ (239>149 m/z).